EXPERIENTIA

EST EXPERIENTIA SCIENTIA PARACELSUS

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:
P. HUBER (Basel) · R. MATTHEY (Lausanne) · A. v. MURALT (Bern) · L. RUZICKA (Zürich)
Redactor: H. MISLIN, Basel-Mainz

BIRKHÄUSER VERLAG BASEL
SUISSE — SCHWEIZ — SVIZZERA — SWITZERLAND

UNIVERSITY OF HAWAII LIBRARY
APR 4 '55

SOMMAIRE - INHALT - SOMMARIO - CONTENTS

T. Caspersson: Quantitative Cytochemical Methods for the Study of Cell Metabolism 45

Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports

N. F. Hayes, R. H. Thomson, and M. St. C. Flett: The Structure of Phenylurethanes 61
D. Cavallini, C. de Marco, B. Mondovì, and G. F. Azzone: A New Synthetic Sulfur-Containing Amino Acid: S-Aminoethylcysteine 61
M. Sela and E. Katchalski: Branched Polyamino Acids 62
E. Schlittler, P. R. Ulshafer, Mary L. Pandow, Regina M. Hunt, and L. Dorfman: Rauwolfia Alkaloids, XVI. Deserpidine, a New Alkaloid from *Rauwolfia canescens* 64
E. Dodt: Zur Frage der thermoelastischen Eigenschaften des Nerven 65
R. Amprino: On the Incorporation of Radiosulfate in the Cartilage 65
F. Gross, P. Loustalot und R. Meier: Vergleichende Untersuchungen über die hypertensive Wirkung von Aldosteron und Desoxycorticosteron 67
P. Desaulles, W. Schuler und R. Meier: Vergleich der Wirkung des Aldosterons auf das Fremdkörpergranulom der Ratte mit derjenigen von Cortexon, Corticosteron, Cortison und Hydrocortison 68
S. Bettini and M. Boccacci: The Toxic Action of Halogenated Alkylating Substances on Insects. Inhibition of Triosephosphate Dehydrogenase 70
G. Ludány und L. Perényi: Der Hyaluronsäuregehalt und die «Hyaluronidase»-Aktivität der Leukozyten . . . 71
M. Moulin und W. Wilbrandt: Die Wirkung von Kalium und Calcium auf das Treppenphänomen am Froschherzen 72
L. Michelazzi, Maria Assunta Mor, and M. U. Dianzani: Some Metabolic Changes Occurring in Skeletal and Heart Muscles of Guinea Pigs Treated with Tetanus Toxin 73
V. G. Longo: Acetylcholine, Cholinergic Drugs, and Cortical Electrical Activity 76

Nouveaux livres - Buchbesprechungen - Recensioni - Reviews

Exercises in Theoretical Statistics. By M. G. Kendall (Charles Griffin & Co., Ltd., London, 1954) (Ref. E. Batschelet) 78

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

Studiorum progressus: R. Rometsch und K. Miescher: Eine praktische Transformationsmethode zwischen trichromatischen und Vollfarbkoordinaten 79
Congressus 88

EXPERIENTIA

L'EXPERIENTIA publiera:

1. des *articles originaux* sur les récentes recherches scientifiques écrits dans une des langues principales;
2. de *brèves communications;*
3. informera ses lecteurs des événements marquants de la vie scientifique, donnera des *comptes rendus concernant les récentes publications, les congrès et les assemblées.*

Die EXPERIENTIA stellt sich die Aufgabe:

1. durch *zusammenfassende Originalartikel* in einer der wissenschaftlichen Hauptsprachen von Autoren aus verschiedenen Ländern über Forschungsergebnisse berichten zu lassen, die im Vordergrund des Interesses stehen;
2. kurze *Mitteilungen* aufzunehmen;
3. durch Besprechung neuerschienener *Bücher*, durch Referate über *Kongresse* und *Versammlungen* sowie durch andere Mitteilungen über die bedeutendsten Ereignisse des naturwissenschaftlichen Lebens zu informieren.

EXPERIENTIA si propone di pubblicare:

1. *articoli originali riassuntivi*, in una delle principali lingue usate dalla scienza, ad opera di autori di diversi paesi, su risultati scientifici di grande interesse;
2. *brevi comunicazioni;*
3. *recensioni di nuovi libri, relazioni di congressi e riunioni*, come pure altre comunicazioni su importanti avvenimenti nel campo delle scienze naturali.

The aim of EXPERIENTIA is:

1. to publish comprehensive articles embodying the results of recent scientific research. These will be written in one of the principal scientific languages and contributed by authors in various countries;
2. to publish *brief reports;*
3. to give information about the most important events in natural science by means of *reviews of the latest books, reports on congresses and meetings*, as well as through other communications.

EXPER.

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an Fr. 36.– pour la Suisse; pour l'étranger fr. 46.–. Ces prix s'entendent en francs suisses.
Adresser toute correspondance touchant la rédaction de l'EXPERIENTIA exclusivement à l'éditeur soussigné.
Dernier délai d'admission pour les manuscrits: 2 mois avant la parution. Les auteurs recevront gratuitement, s'ils le désirent, 50 tirés à part de format 14,5 sur 21 cm, sans couverture. Pour le prix d'un nombre plus grand et pour la couverture s'adresser à l'éditeur. Les tirages à part doivent être commandés *avant* l'impression du périodique.
Prix pour les annonces: $^1/_1$ page fr. 220.–, ½ page fr. 132.–, ¼ page fr. 77.–. Placements spéciaux: prix sur demande. Demandes à l'éditeur.
L'EXPERIENTIA est imprimée en Suisse.

Editions Birkhäuser, Bâle 10 (Suisse), Elisabethenstrasse 15
Tél. 249800; adresse télégraphique: Edita Bâle

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e può esser richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 36.– per la Svizzera; all'estero fr. 46.–. I prezzi vanno intesi valuta svizzera.
Tutti gli invii alla redazione di EXPERIENTIA vanno indirizzati esclusivamente alla sottoindicata casa editrice.
La redazione di ogni fascicolo si chiude 2 mesi prima della pubblicazione.
Gli autori ricevono, su desiderio, 50 estratti del formato 14,5 ×21 cm, senza copertina. Il prezzo degli estratti in più e della copertina viene indicato, su richiesta, dalla casa editrice. Gli estratti vanno ordinati *prima* della stampa della Rivista.
Prezzi per annunci: $^1/_1$ pag. fr. 220.–, ½ pag. fr. 132.–, ¼ pag. fr. 77.–; per pagine speciali, accordi da stabilire. Gli annunci sono da inviare alla casa editrice.
EXPERIENTIA si stampa in Isvizzera.

Casa editrice Birkhäuser, Basilea 10 (Svizzera), Elisabethenstr. 15
Tel. 249800; Indirizzo telegrammi: Edita Basilea

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Auslande durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. In Algerien, Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Italien, Luxemburg, Marokko, Norwegen, Österreich, Portugal, Schweden nehmen auch die Postämter Bestellungen entgegen. Der Abonnementspreis beträgt in der Schweiz Fr. 36.–, im Ausland sFr. 46.–.
Alle Zuschriften an die Redaktion sind ausschliesslich an den Verlag zu richten. Redaktionsschluss 2 Monate vor Erscheinungsdatum.
Die Autoren erhalten auf Wunsch 50 Gratisseparata im Format 14,5 ×21 cm, ohne Umschlag. Die Kosten für weitere Separata und für Umschläge sind beim Verlag zu erfragen. Separata sind *vor* dem Druck der Zeitschrift zu bestellen.
Insertionspreise: $^1/_1$ Seite Fr. 220.–, ½ Seite Fr. 132.–, ¼ Seite Fr. 77.–; für Vorzugsseiten besondere Vereinbarung. Inseratenannahme durch den Verlag.
Die EXPERIENTIA wird in der Schweiz gedruckt.

Birkhäuser Verlag, Basel 10 (Schweiz), Elisabethenstrasse 15
Tel. 249800; Telegrammadresse: Edita Basel

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The annual subscription price by inland mail is fr. 36.–; other countries fr. 46.–. Prices in Swiss currency. All communications to the editors should be addressed to the publishers. All manuscripts for publication in a given number must be in the hands of the publishers 2 months before the publication.
The authors receive, on request, 50 reprints 14,5 ×21 cm without cover free of charge. For the prices of additional reprints and covers, inquiries should be addressed to the publishers. Reprints must be ordered *before* the number is printed.
Prices for advertising: $^1/_1$ page fr. 220.–, ½ page fr. 132.–, ¼ page fr. 77.–. Advertisements should be sent to the publishers.

Published by Birkhäuser Ltd., Basle 10 (Switzerland), Elisabethenstr. 15
Phone 249800; Telegrams: Edita Basle

Printed in Switzerland / Birkhäuser A.G., Basel

Verzeichnis der Inserenten – Liste des annonceurs – List of Advertisers – Experientia XI/2

Academic Press Inc. Publishers, New York
Birkhäuser Verlag, Basel
Ciba AG., Basel
Ganz & Co., Zürich
Sandoz AG., Basel
Trüb, Täuber & Co. AG., Zürich

EXPERIENTIA, SUPPLEMENTUM I

Gegenwartsprobleme der Ernährungsforschung
Present Problems in Nutrition Research
Les problèmes actuels de la nutrition

SYMPOSIUM BASEL, 1.–4. X. 1952

Unter dem Patronat der Internationalen Union der Ernährungswissenschaften – Under the auspices of the International Union of Nutrition Sciences – Sous le patronage de l'Union internationale des sciences de la nutrition
Direction: F. Verzár – Organisation: Experientia

Beiträge:

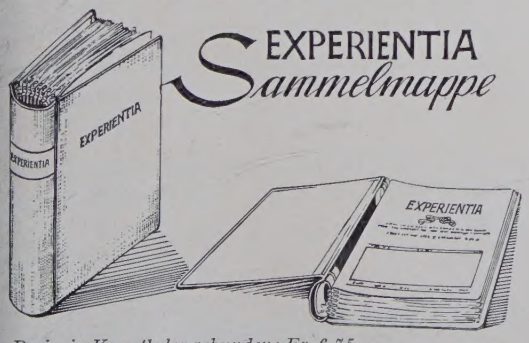
E. Abramson, W. R. Aykroyd, K. Bernhard, A. B. L. Beznák, E. J. Bigwood, H. D. Cremer, D. P. Cuthbertson, H. Dam, V. Demole, S. J. Folley, L. J. Harris, O. Högl, K. Lang, K. Thomas, J. Trémolières, A. G. van Veen, A. I. Virtanen, H. Kraut, J. Kühnau, S. Markees, T. H. Moore, A. Schürch, J. C. Somogyi, F. Terroine etc.

Ganzleinenband – Full cloth – Relié en toile – 1953. 312 Seiten. Fr. 32.– (DM 32.–)

BIRKHÄUSER VERLAG · BASEL/STUTTGART

Elektronenmikroskope
Mikrotome
Elektronendiffraktographen
Hochspannungsoszillographen

Trüb, Täuber · Zürich



EXPERIENTIA *Sammelmappe*

Preis, in Kunstleder gebunden: Fr. 6.75

Diese Mappe hat den Zweck, die Hefte des laufenden Jahrganges zusammenzuhalten, bevor der komplette Jahrgang gebunden werden kann. Die einzelnen Hefte können mittels einer neuartigen, patentierten Haltevorrichtung in die Mappe eingeheftet und im Bedarfsfall wieder herausgelöst werden. Mit dieser geschmackvoll in Kunstleder gebundenen Mappe soll dem Übelstand abgeholfen werden, daß einzelne Hefte im Laufe des Jahres verlorengehen und vor dem Einbinden nachbezogen werden müssen. Die Sammelmappe ist so massiv konstruiert, dass sie ihren Dienst auf Jahre hinaus leisten wird.

BESTELLSCHEIN

An den
Birkhäuser Verlag
Basel 10 (Schweiz)

Ich bestelle ... Sammelmappe(n) zum Preise von Fr. 6.75

Name: _____

Vorname: _____

Ort: _____

Strasse: _____

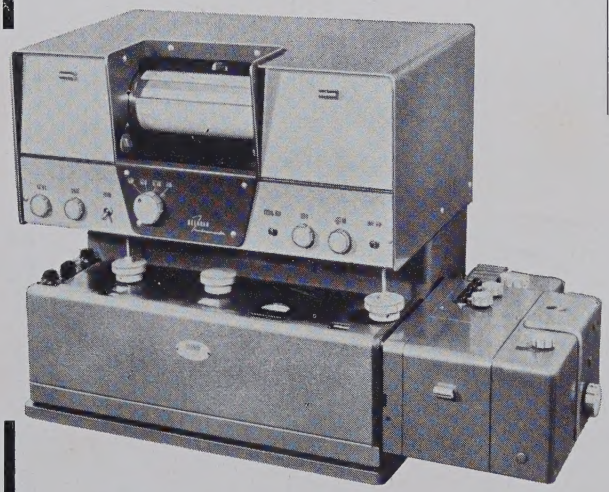
Bitte in Blockschrift schreiben

Neu!

BECKMAN-

MODELL **DR**

Automatik-Zusatz zum
Quarz-Spektralphotometer
Modell **DU**



- Mißt und registriert vollautomatisch die Transmission von 1 – 3 Proben
- Aufzeichnung der Resultate in 3 verschiedenen Farben
- Wellenlängenbereich: 220 mμ bis 1000 mμ
- Meßgeschwindigkeit pro eingestellte Wellenlänge: 12 Sekunden für 3 Proben
- Volle Ausnützung der hohen DU-Präzision
- Automatische Spalteinstellung für optimale Auflösung
- Äußerst einfache Handhabung

Bitte verlangen Sie das BECKMAN-Bulletin 339/E

Auskünfte, Beratung und Angebote durch

GANZ & Co
BAHNHOFSTR. 40
TEL(051) 23 97 73
Zürich

Lehrbuch der Logistik

Von Dr. K. Dürr, ao. Professor an der Universität Zürich. 181 Seiten, Ganzleinen Fr./DM 22.90, broschiert Fr./DM 19.80 (1954).

Integralrechnung auf dem Gebiete mehrerer Variablen

Von Dr. A. Ostrowski, Professor an der Universität Basel. Band III der *Vorlesungen über Differential- und Integralrechnung*. 475 Seiten mit 36 Figuren, Ganzleinen Fr./DM 78.—, broschiert Fr./DM 73.85 (1954).
Band I: *Funktionen einer Variablen*. 373 Seiten mit 42 Figuren, zweite Auflage, Ganzleinen Fr./DM 36.40, broschiert Fr./DM 32.25 (1952).
Band II: *Differentialrechnung auf dem Gebiete mehrerer Variablen*. 484 Seiten mit 55 Figuren, Ganzleinen Fr./DM 69.70, broschiert Fr./DM 65.50 (1951)

Statisch unbestimmte Systeme

Von Dr. Fritz Stüssi, Professor an der ETH. in Zürich. Band II der *Vorlesungen über Baustatik*. 313 Seiten mit 217 Figuren, Ganzleinen Fr./DM 37.45, broschiert Fr./DM 33.30 (1954).
Band I: *Statisch bestimmte Systeme, Spannungsberechnung, Elastische Formänderungen, Stabilitätsprobleme, Seile*. Zweite Auflage, 380 Seiten mit 336 Figuren, Ganzleinen Fr./DM 40.05, broschiert Fr./DM 35.90 (1953).

Einführung in die Hochspannungstechnik

Von Dr. M. Wellauer, Maschinenfabrik Oerlikon. 328 Seiten mit 281 Figuren, Ganzleinen Fr./DM 29.65 (1954).

Schaltungstheorie und Messtechnik des Dezimeter- und Zentimeterwellengebietes

Von Dr. A. Weissfloch, Technischer Direktor der Société Techn. d'Application et de Recherche électronique, Montrouge (Seine) 308 Seiten mit 288 Abbildungen, Ganzleinen Fr./DM 33.50, broschiert Fr./DM 29.30.

Fordern Sie bitte Einzelprospekte und unser wissenschaftliches Verzeichnis an. – Buchbestellung über Ihren Buchhändler.

Birkhäuser Verlag
Basel und Stuttgart

EXPERIENTIA

Vol. XI - Fasc. 2 Pag. 45–88 15. II. 1955

Quantitative Cytochemical Methods for the Study of Cell Metabolism

By T. CASPERSSON[1], Stockholm

I.–*General Problems*

During the last decades biochemical research has penetrated deeply into different aspects of the cell metabolic processes. Vast fields, however, are as yet but superficially known, and there, primarily, the processes for which the inhomogeneous reaction milieu of the structural organization of the cell is a prerequisite. This group includes the majority of the synthetic processes, among them protein synthesis, the basic process of growth. Sections of certain reaction chains connected with energy metabolism which are not so markedly dependent upon structure have been possible to imitate in solutions to some extent, i.e. in structureless model systems. Only in isolated cases and to an extremely limited extent has this been possible for the processes of *cell substance formation* during growth, differentiation and different types of cell function. The heterogeneous structural organization of the cell is of decisive significance here, and the various structural elements of the cell comprise different tools that are all necessary to the course of the process. The difficulties in these fields are due principally to the fact that our knowledge of such fundamental factors as the chemical composition of the individual structural elements within the individual cell and their changes during the different phases of metabolism is as yet only in its infancy. The development of *quantitative* cytochemical procedures is indispensible to a more profound understanding of such metabolic processes. That so comparatively little has thus far been accomplished in the field is contingent in part upon the difficulty in developing dependable quantitative methods for work in this dimensional range (Fig. 1). An even more important factor, however, when it is a question of quantitative work within individual cell-structures, lies in the numerous other technical problems, all demanding resolution, which are encountered in addition to the primary, purely chemical question of method. These include, for example, the procedure of defining the element to be studied and differentiating it from its environment; the method for pretreatment of the object for study, which must not involve such damage that the results of the measurements cannot be applied to the conditions of living cell; and the determination with great accuracy of the geometric dimensions of the minute object under measurement. When it is a question of the technical manipulation of the object during the different phases of the work, a multitude of special technical problems arise. One frequently difficult detail is offered by the calibration of the chemical determination method on model systems of known composition and under the conditions prevailing in measurements in the biologic material. The methods or lines of approach that must be applied in the treatment of these technical questions will be denoted as "auxiliary methods", for the sake of perspicuity, in the

[1] Nobel Institute for Medical Cell Research and the Wallenberg Laboratory for Experimental Cell Research; Institute for Cell Research, Karolinska Institutet, Stockholm.

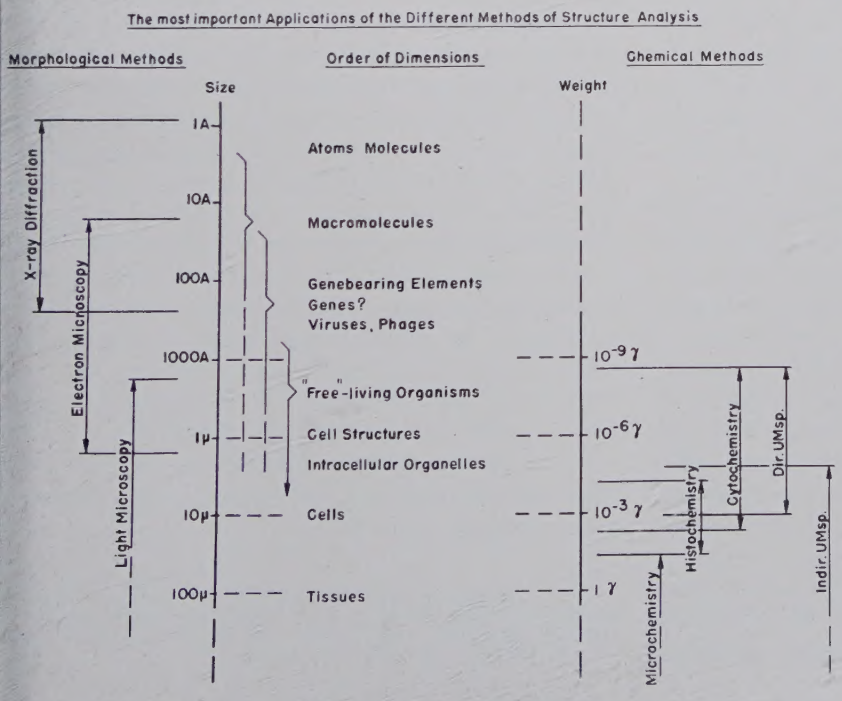


Fig. 1.–The range of application of the cytochemical methods (Dir. UMsp. = Direct ultramicrospectrography).

following discussion. Every cytochemical study aimed at *true quantitative* determination therefore becomes complex and timeconsuming. That which frequently receives little consideration, but is only too clearly evidenced by practical experience, is that the development of the basic measuring techniques represent, as a rule, only a minor portion of the necessary work and instrument investment.

For several of the conceivable cytochemical working lines, however, the necessary auxiliary methods are rather similar in character. Therefore, it might be worth while to attempt to develop more general procedures for solving the collateral technical problems in order subsequently to exploit these results for several different special cytochemical working problems. If such a more general and exacting programme is to be considered justifiable, the methods must satisfy two conditions.

The first is that the methods shall be applicable down to the dimensional region of the cell structures while fulfilling the following special conditions (denoted hereafter as "measuring conditions") for true quantitative cytochemical methods. The second is that the group of methods have sufficient breadth of scope, i.e. that they can be employed for determination of a sufficient number of substances to form a basis for the study of more comprehensive metabolic problems in order to justify the necessary developmental work involved.

The aforementioned measuring conditions which should be satisfied to the greatest extent possible are as follows, when the work is aimed primarily at average cell material from mammals and higher organisms:

(1) Elements with an order of magnitude 1 μ^2 should be accessible to study.

(2) The measuring and preparation for measurement must not damage the preparation to such an extent that the results cannot be transferred to the cell in its natural state.

(3) It shall be possible to carry out the determination with a reasonable and *known* accuracy for the special problem. This assumes (a) definite, known accuracy of measurement (dependent on the measuring instruments), and (b) definite, known accuracy in the analysis of the measured data (dependent on several factors, cf. following). Within the thus far little explored field of cytochemistry there are, to be sure, large groups of problems accessible to study with methods having only low, sometimes even very low, accuracy of measurement, this when the effects studied, e.g. differences in concentration or amounts, are of great magnitude. That the accuracy of measurement in every case be *known*, however, is an absolute prerequisite in quantitative work.

(4) It shall be possible to perform the actual measurements with reasonable speed on the perishable material, and–empirically–by the person, usually a biologist who is most familiar with it and consequently is best able to judge if the object is damaged in any way during the manipulation and, possibly, how such damage may be avoided.

Practical experience primarily from ultra-microspectrographic work with spot measuring apparatus mainly in ultraviolet in the study of a number of biologic and medical problems[1] during the last decade has led us to the *conception that ultra-microspectrography, in a broad sense, satisfies the aforementioned conditions with respect both to possible breadth of scope and to meeting the basic conditions listed herein for a cytochemical study*. Further justification for this view is presented in the following sections II 2 and 3.

Therefore, during recent years *in this institute*, which was specially equipped from the first for this particular purpose, *attempts have been made to develop general working methods on a broad basis in the field, and to find practically applicable procedures in biologic and medical work:* in the first place, for direct microspectrographic study of different metabolic problems, especially those connected with normal or pathologic growth; and, in the second place, to provide a foundation for the technically broader developments required for special types of problems. Presented in the following section, after a technical orientation covering the techniques used in earlier microspectrographic studies, is an outline of the possibilities existing for development of the working range to fulfill the conditions advanced earlier for more comprehensive developmental work: greater breadth of scope and fulfilling of the measuring conditions. The subsequent section treats the technical realization of such measurements.

II.–*The Basis of Ultra-Microspectrography*

(1) *Spot Measurements*. The actual measuring operation in ultra-microspectrography consists of determination of the absorption coefficients in wide regions of the electromagnetic spectrum of small spots within the cell, and the calculation of the absorbing substance content of these regions from the course of the absorption curve. An optical ultra-microspectrograph may be described as a combination of a spectrograph and a microscope system. The object is illuminated with monochromatic light, and the image, enlarged by the microscope, is projected into a photoelectric cell. The diaphragm of the photoelectric cell isolates the spot to be measured in the image. In certain problems the measurement may be done photographically, i.e. the object is photographed in different wavelengths under standardized conditions, and the plates are analyzed in a photographic densitometer.

[1] For survey see T. Caspersson, Skand. Arch. Physiol. *73*, Suppl. 8 (1936); J. Roy. Micr. Soc. *60*, 8 (1940); Naturwissensch. *28*, 514 (1940); Chromosoma *1*, 562 (1940); *Cell Growth and Cell Function* (W. W. Norton & Co., New York, 1950).

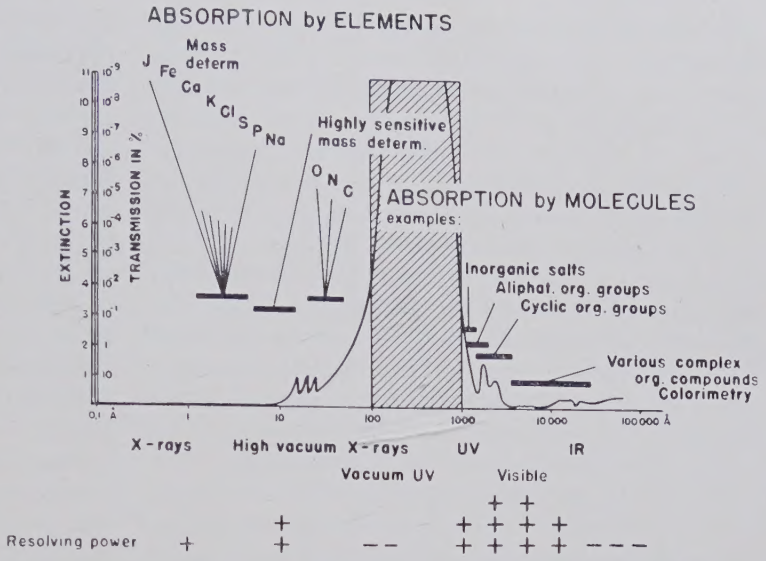


Fig. 2.–The breadth of scope of ultra-microspectrography, used as a tool for quantitative cytochemical work. The curve shows the general course of the absorption for a 5 μ layer of organic tissue.

For work in the X-ray region instruments have been developed with specially constructed X-ray tubes, permitting direct skiagraphy of the object in monochromatic X-ray radiation obtained either with the aid of suitable anticathode material in combination with filters or via monochromatization with curved crystals. Recently, the resolving power of these methods has been increased to the point where direct exploitation for ordinary cytochemical problems has become feasible. The absorption coefficient for the spot to be measured is determined by measuring the photographic high resolution plate in an optical microspectrograph.

For information on practical design and construction of microspectrographs for spot measurements reference is made to CASPERSSON[1] for instruments for the optical region. These works also contain references to earlier studies where the method is applied. About X-ray instruments see ENGSTRÖM[2], and for high resolution X-ray-procedures LINDSTRÖM[3].

(2) *Breadth of Scope.* For practical reasons in the discussion of the breadth of scope it is expedient to divide the field. By *direct* ultra-microspectrography is meant the determination of absorption coefficients of cell structures *in situ* within the cell. *Indirect* microspectrography involves measurement of absorption spectra of objects after they have been isolated with suitable procedures from the cell and possibly subsequently collected into larger quantities, which do not, however, attain the working range of ordinary spectroscopy. These are then treated with chemical agents, e.g. enzymes or colorimetric reagents (ultra-microcolorimetry). The latter methods are little used as yet, but are extremely well suited to further development and have already yielded interesting results. In the following sections principally the direct microspectrographic methods will be treated.

One distinctive feature of direct ultra-microspectrography, in comparison with ordinary macro-scale spectrography, is that the object has a given form, size and composition from the start, meaning that for the individual absorbing objects measured both the concentration and the thickness of the layer are given from the beginning. In ordinary colorimetry and spectrography the arrangements are usually so chosen that the major portion of the measurements takes place within the light transmission range from 70 to 15%, corresponding to extinction coefficients from 0·15 to 0·8, where it is easiest to measure. If a solution falls outside this range, another concentration or a different cuvette length is selected. Such adjustment is impossible in measurements made directly on the biologic object, and thus it must be possible to extend the ultra-microspectrographic work to include an extinction range of much greater breadth. Experience has demonstrated that within the optical region it is expedient to construct a routine apparatus for the extinction range from 0·05 to 1·5, but that above and below this range it is advisable to use measuring equipment designed along other lines than those followed in construction of the routine apparatus. Even in the early optical spectrographs for spot measurement, measurements were possible within this range.

The theoretical breadth of scope for ultra-microspectrographic work on average biologic material with resolving power and measuring range corresponding to that for equipment with the characteristics mentioned earlier can be easily estimated and is apparent from Figure 2. This figure shows diagrammatically the course of the absorption for a 5 μ thickness of a tissue homogenate from average mammalian tissue. The wavelength scale is logarithmic and covers the range from the X-ray region to the infrared. The resolving power for existing instruments appears below the diagram: ++ denotes that a resolution of 1 μ can be attained. This is the minimum for work on intracellular structures. In ultraviolet, visible and infrared the limit is determined for that which can be attained by the wavelength of the light. Theoretically it is impossible to record an absorption spectrum that can be analysed

[1] T. CASPERSSON, Skand. Arch. Physiol. *73*, Suppl. 8 (1936); J. Roy. Micr. Soc. *60*, 8 (1940); Chromosoma *1*, 562 (1940); Exptl. Cell Res. *1*, 595 (1950); *Cell Growth and Cell Function* (W. W. Norton & Co., New York, 1950).

[2] A. ENGSTRÖM, Acta Radiologica, Suppl. *63* (1946).

[3] B. LINDSTRÖM, Exptl. Cell Res. *6*, 537 (1954); unter publication 1954). – B. LINDSTRÖM and G. MOBERGER, Exptl. Cell Res. *6*, 540 (1954).

from a particle which is smaller than 2 to 3 times the wavelength of the light. In the visible and ultraviolet spectral regions optical systems are available which are perfected to the point that this theoretical limit can almost be attained, and the smallest measurable particle thus lies well within the desired limit. In the infrared region optics have been developed, although not with quite the same numerical aperture as in the aforementioned spectral region. Even with ideal optics, however, it is not theoretically possible in this region to attain the resolution necessary for direct microspectrography of cell details. The indirect microspectrographic procedures, however, demand lower resolution, and infrared microspectrography can be used to advantage there.

In the easily accessible part of the ultraviolet region, down to 2000 Å, a very large number of organic compounds included in the cell substance have selective absorptions which can be exploited. The best examples are provided by the nucleic acid group and the cyclic amino acids for which the absorptions per unit of mass as well as the concentrations in the biologic material are of such an order of magnitude that they are easily accessible for work with relatively simple instrumental equipment. This has also been utilized in numerous studies of the nucleotide and protein metabolism (CASPERSSON[1] with references). Among other groups of substances of biologic interest with bands in this region, and which may occur in concentrations such that the absorptions lie within the most easily accessible range for routine spectrography, we might mention sterols, unsaturated fatty acids, purines, steroid hormones, adrenaline and its precursors, thyroxine and related substances, large groups of pigments occurring in biologic material and lignine. In longwave ultraviolet and shortwave visible regions numerous substances related to chlorophyll and haemoglobin have narrow, high absorption bands. The same is true of a number of respiratory ferments and coferments. These latter substances occur in the majority of cases in such minute quantities that special methods are required in order to measure the low absorptions. Within the visible spectral region few substances have sufficiently high absorptions to fall within the working range of routine microspectrography. Primarily chlorophyll and haemoglobin and their derivatives should be mentioned in this connection. The ultra-microcolorimetric methods classified under indirect microspectrography are applicable also in this region.

Below 2000 Å the absorption of organic material increases especially rapidly. The selective absorptions within this region are principally conditional upon atom configurations which are of limited interest to biologic metabolic problems in general. Moreover, the sources of error in the measurements increase since the refractive index of the material rises especially rapidly, with the result that the absorption curves become extremely difficult to interpret. This region is indicated by oblique-line hatching in the figure. On the shortwave side of this region there are absorption discontinuities usable for ultra-microspectrography. These are conditioned by electron jumps in the inner electron orbits in the atoms, and can be utilized practically also for biological work (ENGSTRÖM[1]). They are specific for the different chemical elements and practically completely independent of the chemical linkage of these elements. This last factor is of particular importance to spectrographic work. A technique has also been evolved for a total dry substance determination of water-free biologic material in this region, based on the assumption of a certain average composition of the biologic material (ENGSTRÖM and LINDSTRÖM[2]). Through LINDSTRÖM's studies during the past few years[3] the resolving power and the sensitivity of the method for dry substance determination has been increased to the level necessary for real cytochemical work. The sensitivity of the method has been increased, so far as to make possible work with histological sections of ordinary thickness. The determination of elements was formerly carried out with low resolution, which can, however, be greatly increased along the aforementioned lines developed by LINDSTRÖM. The region for elements with atomic numbers below 8 is also accessible, although the technique is still relatively complicated (LINDSTRÖM and MOBERGER[4]).

In connection with this dry weight determination another method should also be mentioned. Interference microscopy measures optically differences in optical path in different parts of the cell material. Through this it is possible to determine dry weight on condition that there is a certain composition of the biologic material. An optical spot measuring procedure has been applied to biological objects mainly by DAVIES *et al*[5]. In principle the procedure involves conversion by aid of suitable optics of optical path differences between rays passing different parts of the preparation into differences in light transmission. Therefore, practical work with the method can also be carried out photo-electrically directly after introduction of interference optics, with the microspectrographic apparatus described[6]. Generally seen, the method gives the same results as the

[1] T. CASPERSSON, *Cell Growth and Cell Function* (W. W. Norton & Co., New York, 1950).

[1] A. ENGSTRÖM, Acta Radiologia, Suppl. *63* (1946).

[2] A. ENGSTRÖM and B. LINDSTRÖM, Biochim. Biophys. Ac. *4*, 351 (1950).

[3] B. LINDSTRÖM, Exptl. Cell Res. *6*, 537 (1954); under publication (1954). – B. LINDSTRÖM and G. MOBERGER, Exptl. Cell Res. *6*, 540 (1954).

[4] B. LINDSTRÖM and G. MOBERGER, Exptl. Cell Res. *6*, 540 (1954).

[5] H. G. DAVIES, Exptl. Cell Res. (1952). – H. G. DAVIES, J. CHAYEN, M. H. F. WILKINS, and L. F. LACOUR, in press. (1954).

[6] T. CASPERSSON, Anais da Ac. Bras. *26*, 199 (1954). – T. CASPERSSON, L. CARLSON, and G. SVENSSON, Exptl. Cell Res. *7*, 601 (1954).

previously described X-ray mass determination method and requires largely the same assumptions with respect to the average composition of the object, which gives it the same limitations in that respect. In addition, there is the difficulty due to the fact that with high concentrations the optical path difference is not always a linear function of the quantity of dissolved substance. On the other hand, the method has the very great advantage of being applicable to undehydrated preparations. Therefore, the two procedures are excellently complementary. Interference microscopy has been discussed at this place since the difficulties encountered in its application for study of biologic material, which are contingent upon its inhomogeneity, are to a great extent the same as in actual microspectrography.

Summary: Ultra-microspectrographic methods have qualifications adapting them to determination of a large number of biologically important substances with selective absorptions in the optical region. In addition, they may be exploited for certain element determinations and, under certain conditions, also for dry-weight determinations on both dried and undehydrated preparations (the latter in combination with interference microphotometry). With *indirect* microspectrographic procedure they are also utilizable for reading colorimetric reactions in ultramicro scale, extraction or enzyme digestion experiments, etc. The procedure thus has sufficient *breadth of scope* to form a basis for a relatively general cytochemical working method with appreciable range of applicability.

(3) *Measuring Conditions.* The first of the special technical conditions mentioned in section I, that should be satisfied by a quantitative cytochemical method, i.e. that the resolving power should be better than 1 μ^2, has been shown to be fulfilled for spot measurements within the optical region up to shortwave infrared and in parts of the X-ray region. Interference microscopy also permits a similar resolving power. Because of the structure of the average biologic material it would be meaningless in the most common cases to work with resolutions under 0·1 μ^2. This entire dimensional range, 1·0 to 0·1 μ^2, is easily accessible in the most important working region, middle ultraviolet.

Condition 2, that the measuring operation and the preparation for it should not involve greater damage to the preparation than that the result might be transferred to the cell in its natural state, can be met to an appreciable extent on condition that–particularly in the ultraviolet region–the irradiation of the object during the measurement and preparation for it be kept at a minimum. If this condition is observed, moreover, ultraviolet microspectroscopy is in an unusually favourable position among cytochemical working lines in that, to a certain extent, studies are possible even *directly* on the living material. As a rule, the procedure in this is such that the actual examination is carried out on fixed material, whereafter, with especially cautious technique involving a minimum of irradiation and manipulation, the extent to which results obtained can be applied to living material, is investigated as a separate step in the work.

The pretreatment of the object to satisfy measuring condition 2 demands, as a rule, a relatively circumstantial technique. This procedure is among the most time-consuming of the different auxiliary methods, referred to earlier, for the different types of work. Particularly with respect to the work in ultraviolet especially extensive experience has been gained on widely varying types of material[1].

Condition 3, that the determination should be carried out with reasonable and *known* accuracy for the particular problem, involves two factors. The first factor (3*a* above in section I) presupposes that the actual measurement in the spectrograph takes place with definite, known accuracy, which is contingent upon the measuring instruments. This factor is easily controlled. The second factor (3*b* in section I) presupposes definite, known accuracy in the *analysis of the measured data.* This in turn presupposes principally the following factors: α) the optical characteristics of the individual object measured are known; β) the influence of certain sources of error given mainly by light refraction and scattering in the object can be controlled; γ) it can be demonstrated that the object fulfills the conditions–which are relatively complex and strict especially for the optical region–that theoretical treatment of the pathway of the beam in the optical spectrograph as shown must be fulfilled if measurement and analysis are to be possible at all[2]; and δ) the optical constants for the type of substances to be measured are known under the conditions prevailing in the object during measurement. Of these conditions the earlier-mentioned spot measurement spectrographs satisfy in the first place factors α and β, and, with certain limitations, factors γ and δ for work in ultraviolet with nucleic acids and certain proteins. For more general spectrographic working methods, however, the development of special devices in which were possible to carry out the special determinations demanded by factors γ and δ *is unavoidably necessary.* In the literature it is possible only in extremely rare cases to obtain values for the optical constants in question under the conditions prevailing in the cell. The reason is that the manipulation of model systems with the extraordinarily high concentrations and thin layers required offers very great technical difficulties. In each more comprehensive spectrographic working system it must be assumed that the observer personally

[1] T. Caspersson, *Cell Growth and Cell Function* (W. W. Norton & Co., New York, 1950).

[2] T. Caspersson, Skand. Arch. Physiol. *73*, Suppl. 8 (1936); *Cell Growth and Cell Function* (W. W. Norton & Co., New York, 1950).

performs such determinations, and, therefore, an ultra-microspectrographic set of instrumentation must also include special equipment for this purpose.

Condition 4, which demands that the measurements shall be possible to perform with reasonable speed and be sufficiently simple so that the biologist who is most familiar with the material can operate the apparatus, even with a limited previous physical-technical experience, is not fulfilled by the earlier high resolution instruments.

Summary: Even the early ultra-microspectrographic procedures fulfilled certain of the most important measuring conditions listed in the foregoing paragraphs. In order to satisfy the others it is necessary to evolve new methods. The practical development of these methods is presented in section IV below.

III.–*Area Measurement ("Scanning Measurements")*

In the foregoing chapter it has been shown that ultra-microspectrography, due to its breadth of scope and the good possibilities existing for the construction of equipment that fulfills the primary conditions of measurement, possesses qualifications for serving as a foundation for general quantitative cytochemical work on several types of cytometabolic problems.

Experience from the practical application, principally in ultraviolet, however, has shown that biologic problems in general necessitate another measuring procedure in addition to "spot measurement", i.e. "area measurement" or "scanning measurement" which is the term preferred in the continuation. This is of such great practical importance that it must be treated in detail. Spot measurements give information only on the composition of an extremely small part of the object. For broader cytochemical problems this is not sufficient; it is necessary to determine the total content of a certain absorbing substance within a certain optical *cross-section area* of the preparation, as a rule one cell, a cell nucleus or another defined part of a cell.

This "area measurement", i.e. *measurement of the total quantity of an absorbing substance within a defined region* in the preparation can be performed with spot measuring equipment by measurement of a very large number of separate spots. For measurement of a mammalian cell, for example, such a determination, photographic or photoelectric, requires, however, an enormous number of separate measuring spots because of the inhomogeneous character of the average cell material. For example, if the determination includes three wavelengths in ultraviolet, analysis of a single cell with spot measurement equipment requires about two weeks' work.

For the general biologic work, where it is usually a matter of collecting observation material not only from inhomogeneous cells but also from inhomogeneous populations of inhomogeneous cells, this circumstantiality in area measurement has meant such a fundamental limitation that *this factor has been the most essential reason why the broad potential working range offered by ultra-microspectrography has thus far been exploitable only for relatively very limited problems.*

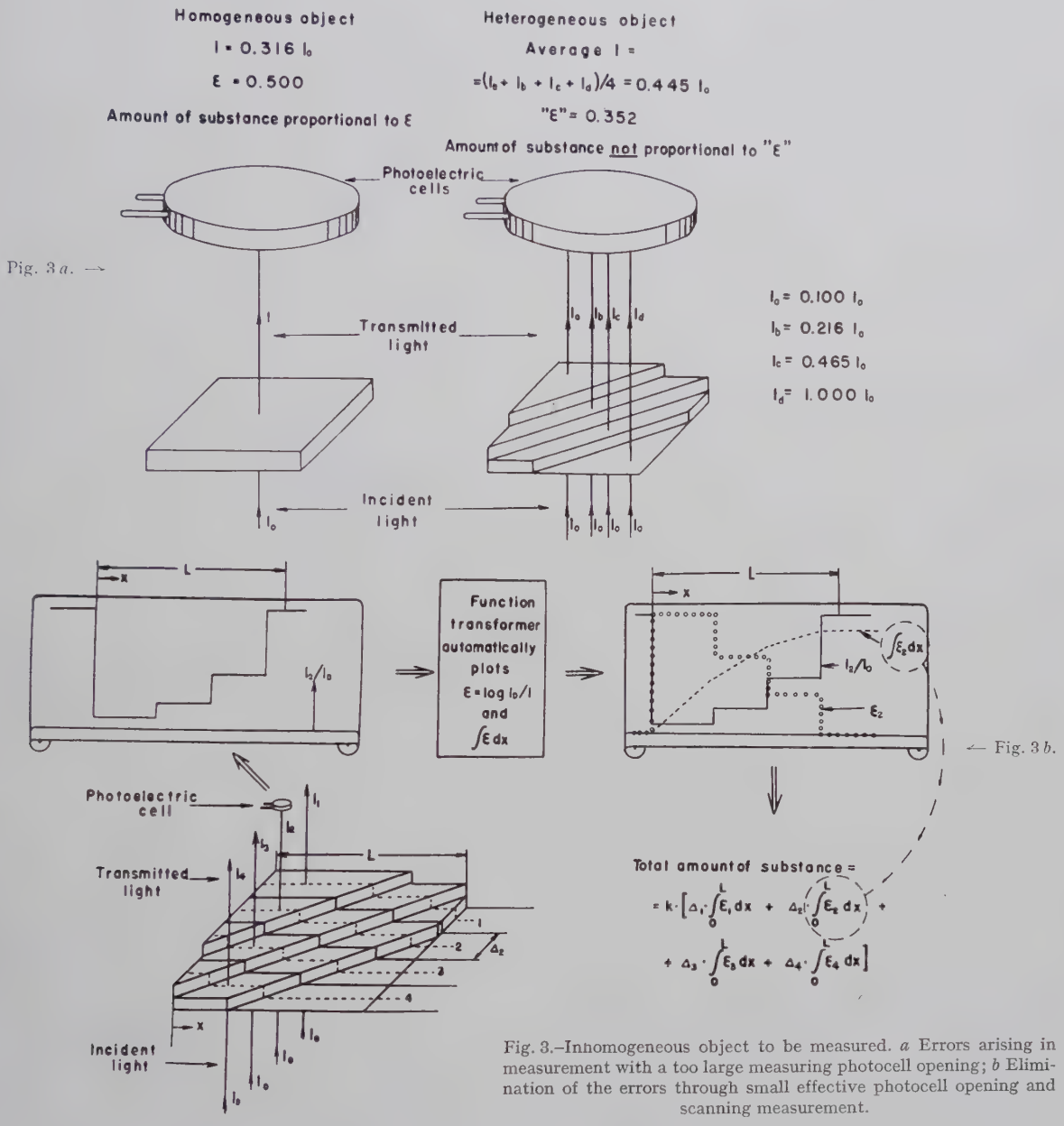
For practical work this question of area measurement, i.e. the mastery of the inhomogeneities of the material through special, very rapid measuring procedures, is a central problem of such great importance that it dominates the development of the entire instrumentation necessary for microspectrography in general. It is only through the technical advances of recent years that this question has been resolved by automatization of both the measurement (scanning) and the data analysis by means of instruments which afford more than one hundred-fold saving of time and are at the same time sufficiently simple and easily operated for routine biologic work[1].

The problems treated in this type of measuring work are illustrated by the following typical example: The quantity of nucleotides in the cytoplasm in a 5 μ thick section through a mammalian cell is to be determined. The section passes the nucleus, and the nuclear nucleotides will not be included in the determination. The cell borders on other cells on all sides and a minor area in the neighbourhood is free of substance (compare Fig. 4). Detailed measurements of the course of the absorption curve in several different spots in the cell has shown that the curves giving the logarithm of extinction plotted against the wavelength have a parallel course, meaning that the percentual composition of the different portions of the cell is the same. For reasons that are discussed in detail elsewhere, the most expedient subsequent procedure is to carry out area measurements in three wavelengths over the entire cytoplasm: one at the nucleotide absorption maximum, one at the tyrosine-tryptophane absorption region, and one at approximately 3150 Å. The two longwave measurements serve as a control that the percentual composition actually does not vary within the small portions of the cell and that certain types of measuring error have not occurred.

The only possible way to perform this measurement is to measure with high resolution an extremely large number of individual spots in the preparation, sufficient so that they surely represent together the cross-section of the entire cell. This is succeeded by recalculation of the individual transmission values of each individual spot to extinction and summation of all these separate spot extinctions over the cell area.

[1] T. Caspersson, Exptl. Cell Res. *1*, 595 (1950); Genetica Iberica *2*, 277 (1951); Exptl. Cell Res. *7*, 598 (1954); Verh. Anat. Ges. Münster *1954*. – T. Caspersson, F. Jacobsson, and G. Lomakka, Exptl. Cell Res. *2*, 301 (1951). – T. Caspersson, F. Jacobson, G. Lomakka, G. Svensson, and R. Sävström, Exptl. Cell Res. *5*, 560 (1953). – T. Caspersson, F. Jacobsson, G. Lomakka, and G. Svensson, Exptl. Cell Res. *5* (1954).

The procedure has been suggested in the literature, nd even carried out in many cases, of widening the perture of the light-sensitive cell and projecting a rge portion of the object or even the whole surface to measured into the aperture of the photo-electric cross-section area. When measured in the same manner, it gives a value for the "extinction coefficient" which is not a measure of the total quantity of absorbing substance because the light transmission is a *logarithmic* function of the quantity of substance through which


Homogeneous object
I = 0.316 I₀
ε = 0.500
Amount of substance proportional to ε
Heterogeneous object
Average I =
=(I_a + I_b + I_c + I_d)/4 = 0.445 I₀
"ε" = 0.352
Amount of substance not proportional to "ε"
Photoelectric cells
Transmitted light
Incident light
I_a = 0.100 I₀
I_b = 0.216 I₀
I_c = 0.465 I₀
I_d = 1.000 I₀
Function transformer automatically plots ε = log I₀/I and ∫ε dx
Photoelectric cell
Transmitted light
Incident light
Total amount of substance =
= k·[Δ₁·∫₀ᴸ ε₁ dx + Δ₂·∫₀ᴸ ε₂ dx +
+ Δ₃·∫₀ᴸ ε₃ dx + Δ₄·∫₀ᴸ ε₄ dx]

Pig. 3*a*. →

← Fig. 3*b*.

Fig. 3.–Inhomogeneous object to be measured. *a* Errors arising in measurement with a too large measuring photocell opening; *b* Elimination of the errors through small effective photocell opening and scanning measurement.

ll. This procedure is not permissible. Figure 3*a*, left lf, presents a diagram of a model object illuminated th a wide light beam. The entire image of the tended object is projected via an optical system (not etched in on the figure) into the aperture of a easuring photo-electric cell. *If the object lacked inmogeneities* this procedure would be permissible, and e extinction coefficient would then be a true measure the quantity of substance passed by the light rays. ie right half of the diagram shows the same amount substance spread inhomogenously over the same the light passes. In the case cited there is a 30% error in measurement. The case demonstrates a fairly average degree of inhomogeneity in the biologic material. It is quite usual to encounter much more inhomogeneous objects. Only in very rare cases, e.g. in the squamous epithelium of the buccal mucosa, which unfortunately is frequently selected for demonstration, are the conditions in the first mentioned case (fig. 3*a*, left) approached. The figure thus illustrates how an error originates when excessively large measuring areas are used, i.e. how too *low resolution* introduces measuring

errors of great magnitude. It is especially important that this error is greatly dependent, both with respect to relative and absolute magnitude, upon the level of the absorption, which means, for example in the case cited in illustration, that its magnitude will be entirely different in the different wavelengths. If measured data in which this error is inherent are used in drawing up an absorption curve, both its *form and the absolute values of the individual extinctions will be erroneous*. The only way to avoid this source of error is to work with such high resolution and with such a large number of measuring spots that the separate inhomogeneities are spot measurements and demand an individual measuring spot in average cell material of an order between 0·1 and 1 μ^2.

The necessity of having a large number of measuring spots, each to be individually recalculated, leads naturally to the evolution of automatic scanning procedure. Figure 3*b* (and 4) shows the principle of the measuring procedure used in the spectrograph, described hereafter, which, fully elaborated with automatic data analyzer, results in a several hundred-fold increase in working speed in comparison with older procedures. The object is the same as in Figure 3. The measurement takes place through a very small measuring spot, symbolized by a small photo-electric cell (the optics are not sketched in), which is moved over the object while a recording instrument continuously records the light transmission as a function of the movement over the object. If the recorded transmission curve is converted point by point to a magnitude proportional to the quantity of substance through which the light beam has passed–in the optical spectral region, the extinction coefficient–the area under the extinction curve from the point where the moving beam enters the object to that where it leaves it on the other side, is a measure of the quantity of substance passed by the measuring beam during its passage across the object. The sum of these sums for a suitable number of scanning lines gives, multiplied by the distance between the scanning lines, the value sought for "the total extinction" for the entire area. Since, as in the example selected, there are in the practical work on biological material almost always certain parts of the scanned area (e.g. cell nucleus, surrounding tissue) which should not be included in the determination, it has proved necessary in practice always to *record each individual measuring spot* and, in the data analysis of the transmission curve to plot also the extinction curve and its integral in every detail. One effect of this condition is also that it must be possible to correlate each point on the recorded curve with the measured spot in the object with an accuracy better than 0·3 μ in the object, which puts considerable demands on the mechanical construction elements of the scanning ultra-microspectrograph.

The practical design of the scanning device is a matter of compromise. On the one hand, it is desirable to have the greatest possible rapidity in the work with retention of high resolution and accuracy of measurement, without excessive irradiation of the object. On the other, the apparatus must not be too complex or difficult to operate for use in routine biologic work in the extremely large measurement series usually encountered in this field. It is unavoidable for several reasons that each individual measuring spot shall be identifiable in the recording after the completion of the measuring operation. There must be a guarantee that no point outside the object to be measured is included, e.g. from adjacent cells or, as in

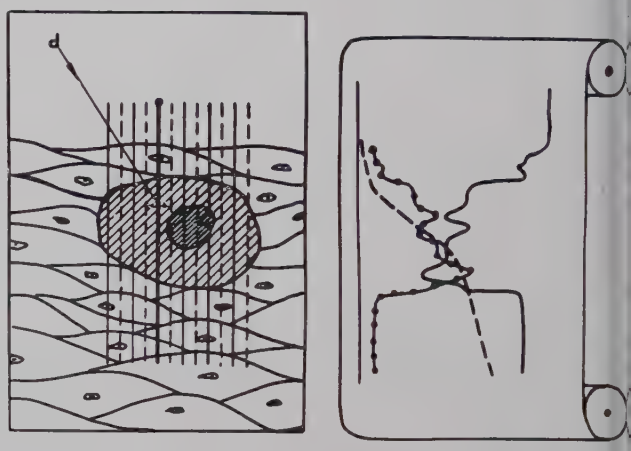


Fig. 4.–Recording scanning of ordinary object with curve analysis

the example cited, the cell nucleus and Figure represents in fact the most common type of object encountered. In the overwhelming majority of instances the work must be carried out in several wavelengths, wherefore it is necessary, for the control of the exactitude of the work, to leave the possibility open, after the completion of the measurements, for the comparison for each individual measuring point of the absorptions in different wavelengths. A common source of error lies in the preparation changing form during the course of the measuring. In the practical design of the scanning equipment, direct two dimensional scanning was not used despite the great saving of time it would seem to allow. The effort to limit with certainty the measurement to the intended object which is usually irregular in shape would thus become too great and time-consuming. Moreover, the necessity of being able subsequently to identify and verify data from individual measuring spots is more difficult to meet with a reasonable set up of equipment. In addition, the risk of excessive irradiation of the object is greater. The apparatus described hereafter was instead designed so that the area may be traversed by an adjustable number of scanning lines with easily adjustable distance between lines and individual

cordings are made of each scanning line. Practical xperience from mammalian and biologic material uring the three years the apparatus has been in nstant routine use has also brought the somewhat rprising realization that, even in quite inhomogene- us cells where very high resolution is required, the *gree* of inhomogeneity is frequently so similar over rge sections of the cell that only a small number of anning lines are required per cell in order, together ith the value of the optical cross-section area of the cell, μ^2, to give the total quantity of absorbing substance. Through the use of automatic scanning with trans- ission recording the gain in time in practical work from ten to a hundred-fold, according to the nature the material. The further desirable decrease in orking time is attained through automatic data halysis. A computer has been developed for this rpose. It performs the transformations and inte- ates the recalculated curve, recording the results ther concurrently with the performance of the easurements in the microspectrograph or as a special eration later. The latter is often more expedient in laboratory where several persons work with the struments. For the different fields of work mentioned rlier: optical spectrography, microphotometry of -ray radiograms and scanning interference micro- otometry, the function used in conversion differs. the first instance it is a simple logarithmic function; the second an empirically derived function, the nsity curve for the plate material; in the third case trigonometric function. For this reason the com- ter was designed so that the transformation of the nction may be carried out according to an arbitrarily justable function so that the results from all types measuring procedure can be dealt with.

It is self-evident that the inhomogeneity problems interference microscopy and microphotometry are the same nature as those mentioned earlier for icrospectrography. As a rule, they present still more fficulty. Because of the course of the function giving e relation between the light from the measured ele- ent and the optical pathway the risk of errors in easurement with too low resolving power, if the path fferences are of certain common orders of magnitude, greater than in absorption spectrography. The tuation differs with the optical arrangement chosen. nly in occasional objects, such as the aforementioned iccal epithelial cells, erythrocytes, etc., or in jects so thick that the inhomogeneities counter- alance one another– a case that is of little practical alue, however–is it possible to work with spot meas- ements which can be carried out visually with the dinary interference microscope.

IV.–*Instrumentation for General Quantitative Cytochemical Work*

In order to exploit the possibilities afforded by rect microspectrography, according to section II:2, devices are necessary for automatic measurement as described in section III. These must fulfill the principal measuring conditions: Measurement with resolution better than 1 μ^2 with known accuracy, without damaging the object, and with simple, rapid and easily operated equipment. In addition, there are the aforementioned *auxiliary methods*. The most important of these serve the following purposes: Preparation of the object in a manner such that its optical characteristics after the treatment are sufficiently known so that the data obtained in a spectrograph with definite optical characteristics can be analyzed with the desired degree of accuracy. This field includes also the mechanical isolation, microdissection, ultracentrifugation, etc., and the creation of a "free field" near the site of measurement to provide a sufficiently accurate measure of the intensity of the incident light. From the discussion of scanning methods above it is evident that various types of procedures for separation of individual cells for determinations of total quantity, together with methods for standardization and control of the cutting of microtome sections are indispensable. The necessity to be able to study the same object in different wavelength regions also places special requirements on the auxiliary procedures. In such work it must be possible to relocate definite points in the object, in repeated measurements in the same object. The measurement of the dimensions of the object plays an important rôle, and for certain problems, especially in work with small objects, this has brought about the development of special methods. In order that the measured curves obtained in the microspectrograph may be broken down into their separate components, the optical characteristics of the measured object must be such that they are suitable for measurement with the technically realizable apertures in the spectrographs, and the optical characteristics of the constituent components must be known under the conditions of measurement. Both these factors require special instrumentation.

Practical Design. The scanning measuring procedure in itself demands an appreciable amount of equipment. To avoid duplication the instrumentation has been so planned that in one central instrument, *the universal microspectrograph*, the greater proportion of the more costly instrumental parts have been assembled into one unit in a manner permitting their exploitation for several different steps in the work. Moreover, the universal microspectrograph has been designed on a "building block" system so that various devices may be included as auxiliary parts, e.g. equipment for measuring especially high or low absorptions, for dichroism measurement, for measurement on model substances of the range of validity of Lambert-Beer's law, devices for recording the absorption dependent on the wavelength, measurements of ultra-microcolorimetry cuvettes, and the data analyzers. The high resolving power

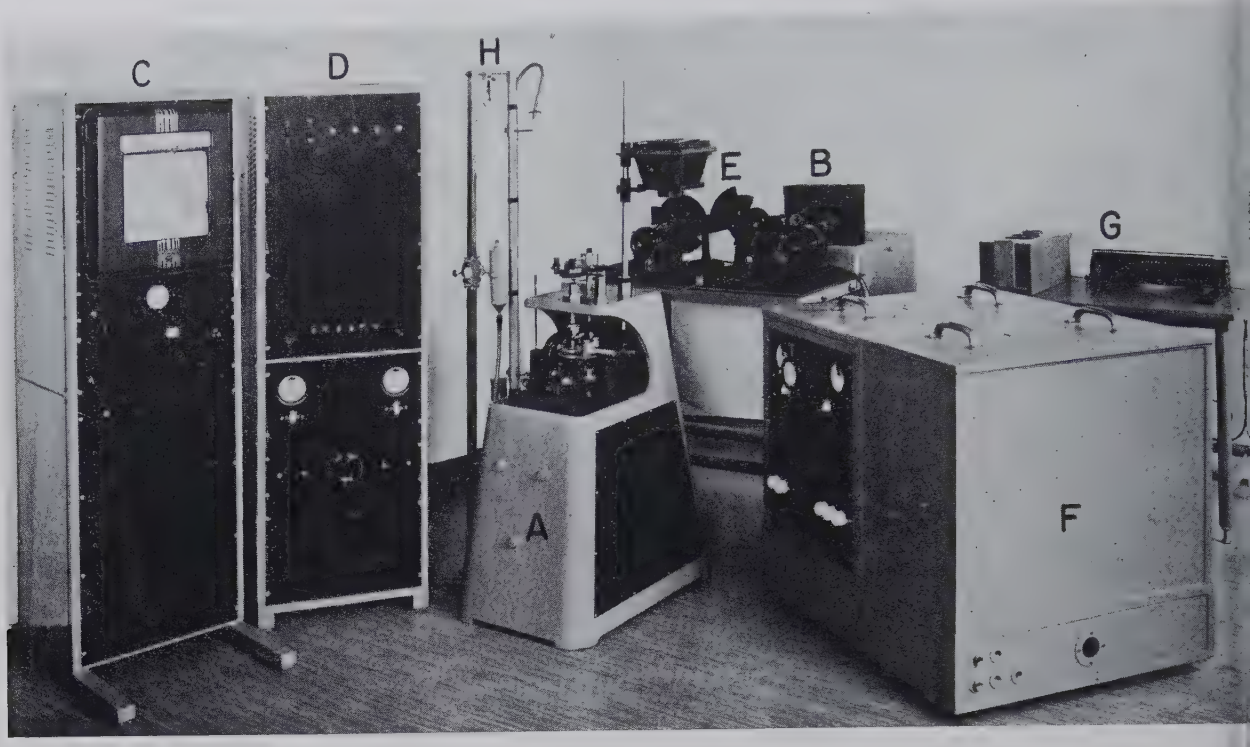


Fig. 5.–The universal ultra-microspectrograph. General view.

and the need for an extremely small measuring spot require the use of light sources with the highest possible specific light intensity and photo-electric measuring apparatus with the greatest sensitivity attainable. The necessity in both scanning and spot measurement that repeated measurements of the *same* spots in the object be possible, e.g. in different wavelengths, requires object movement with a reproducibility of 0·1 μ which presupposes extremely stable mechanical devices.

Mechanically it would be simpler, for example in scanning, to move the image instead of the object itself. For several reasons, however, it is possible to attain far greater accuracy of measurement with a movable object[1].

The main lines of design are shown in Figures 5 and 6. In the following description the letters refer to Figure 5 and the numbers to Figure 6. The central part of the optical system is assembled in very heavy cast iron framework *A*, which contains the monochromator *5* with exchangeable light sources *1–4* in its lower portion. The middle part contains the exchangeable microscope or interference microscope optics *7–11* and the device for moving the object to be measured *26, 27*. This part on which the demands for stability and precision of performance are especially high is also shown in Figure 7. The upper part of the cast iron chassis supports devices for centering the measuring beam *12*. From *A* the measuring beam and the comparison beam pass to the photo-electric cells in the photo cell housing *B*. The electronic measuring equip ment is assembled in rack *C*, where the transmitte light intensity is recorded by the recording instrume *9*, and an oscilloscope *18*, serves as a balance indicat in spot measurements. At the measurement the obje is moved forwards and backwards at an arbitrari chosen rate regulated with a lever by the observe Figures 8*a* and *b* show the principles for the tw measuring methods.

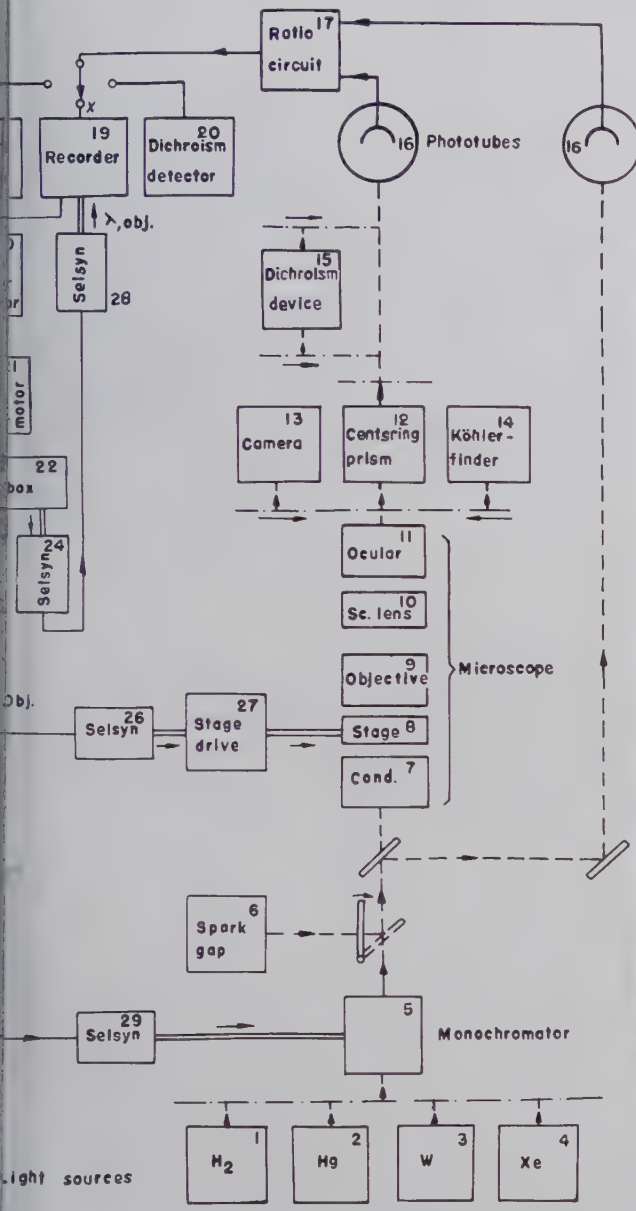
The *Survey of Instrumentation* presents the enti group of equipment and the necessary auxiliary m thods and instruments arranged according to the ste in a cytochemical investigation. The procedures a divided into two groups: general or earlier labor tory methods, and methods that have been new evolved in this institute or modified especially for t cytochemical working operations[1].

(1) *Investigation of the Living Object.* Work on livi material before the absorption investigation is carri out with conventional light optical procedures, ultr violet microscopy or interference procedures. Actu measurements on living material with spectrography interference microphotometry rarely have any meani because of the extensive light dispersion in average c material, the movements within the cell (both prot plasmic currents and Brownian movement), a because, as a rule, in the living cell there is not optic free projection of individual cell organelles from the environment. In optical microspectrographic work,

[1] T. Caspersson, *Cell Growth and Cell Function* (W. W. Norton & Co., New York, 1950); Chromosoma *1*, 562 (1940).

[1] An universal-microspectrograph corresponding to the described here is to be produced commercially in the near future Carl Zeiss, Oberkochen.

e other hand, it is frequently advantageous, after e examination of fixed material is completed, to mpare in individual wavelengths the distribution of e absorption between the living object and the fixed ject. Photographic ultraviolet microspectrophoto-



ig. 6.–The universal ultra-microspectrograph. Block-diagram (The identifying numbers are explained in the text).

hetry[1] is then especially suitable for several technical easons, and its limited accuracy is not even a funda- hental disadvantage.

(2) *Determination of the Dimensions of the Object.* Optical cross-section determinations can be carried out n larger objects with ordinary photographic or pro- ection-planicentric procedures. Especially for studies f the endonuclear structures, primarily the nucleolar system, and for study of changes in nuclear volume, a method is required which permits measurement to the limit of technical possibility in the visible region and on extensive series. In as much as the projection-technical, the photographic and the statistical methods are each too inexact or too circumstantial, a special microplanimeter (Fig. 9), permitting serial measurements down to the limit of the resolving power has been developed[1] for measurements in connection with microspectrography. The apparatus is simple in design and can be constructed to permit concurrent accumulation of measurements of large series of, for example, nucleoli, nuclei and cytoplasms of the same cells simultaneously.

Fig. 7.–Central part of the universal spectrograph.

Determination of the thickness of the object is without great practical importance in most types of work. As the extinction is proportional to the concentration multiplied by the thickness of the layer, it is unnecessary to know the thickness of the preparation when it is a question of determination of the total quantity in whole isolated cells, for example. For sectioned preparations the distance between the slide and the cover glass can be determined with great accuracy with conventional interference or reflection methods. This distance is as a rule considerably larger than the thickness of the sectioned preparation which in average cell material cannot be determined with any method

[1] T. Caspersson, Skand. Arch. Physiol. *73*, Suppl. 8 (1936).

[1] T. Caspersson, T. Fredriksson, and K. G. Thorsson, Hereditas *49*, 201 (1953).

Survey of Instrumentation for Ultra-microspectrographic Quantitative Cytochemistry

Procedures	Instruments: General	Instruments: Specially developed or adapted	Method Combinations
1. Examination of the object in living state.	Usual microscopical procedures. UV-microscopy. Phase contrast.	Photographic UV-microspectrophotometry.	
2. Determination of the dimensions of the object.	Usual microscopical procedures. Interferometrical dedermination of the thickness of the preparation.	Microplanimeter. Certain methods for measuring the thickness.	
3. Preparation of the object.	Usual hist. procedures. Micromanipulation	Freezing drying equipment. Methods for control of microtome sectioning.	
4. Determination of weight.	..... Interference micr. point measurement.	High vacuum X-ray spectrograph for mass determination. Interference microphotometer.	Point measurement
5. Determination of biologically important elements.	.....	X-ray spectrograph for elementary analysis.	Point measurement
6. Determination of molecules absorbing in the optical reg.	..... Universal umsp. for opt. spectr.	2000–2500 A 2480–3300 A 3300–IR Dichroism measurements. Different ranges of transmission. Different requirements of accuracy. Different measuring areas down to the limit of resolution. Indirect microspectrography. Ultra-microcolorimetry in abs. cells Ultra-microcolorimetry in "droplets"	Point measurement Scanning measurement
7. Determination of compounds after special pretreatments. (Isolation, extraction or colorimetry in ultra-micro scale.) (Routine procedures in development.)			Scanning measurement
8. Control of certain optical properties of the object.	. . . . .	Instr. for regist. measurements of the light distribution around the object.	
9. Measurements of the optical properties of substances to be measured.	. . . . .	"Lens cuvette". Refractometer for model subst. in ultra-micro scale.	
10. Analysis of data.	. . . . .	Extinction calculator with integrator. General function transformer with integrator.	

ther than with very low accuracy because the upper nd lower surfaces of the sectioned preparation are no nger plane but rather extremely uneven after the

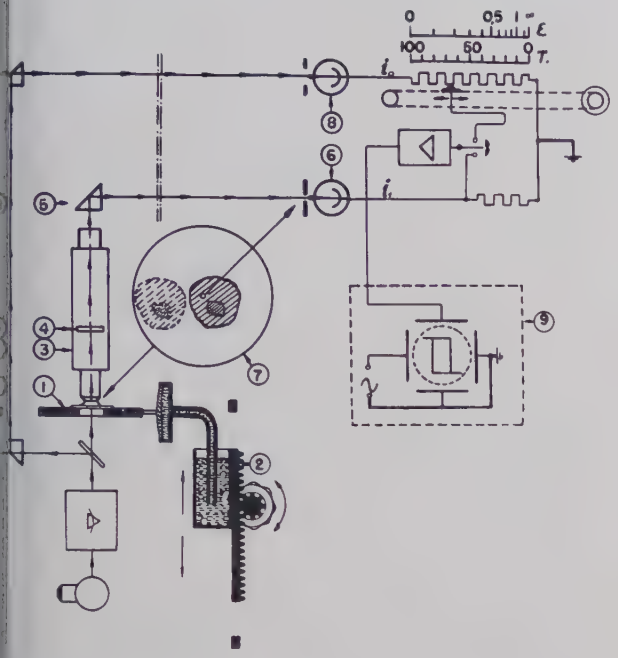


Fig. 8 *a*.

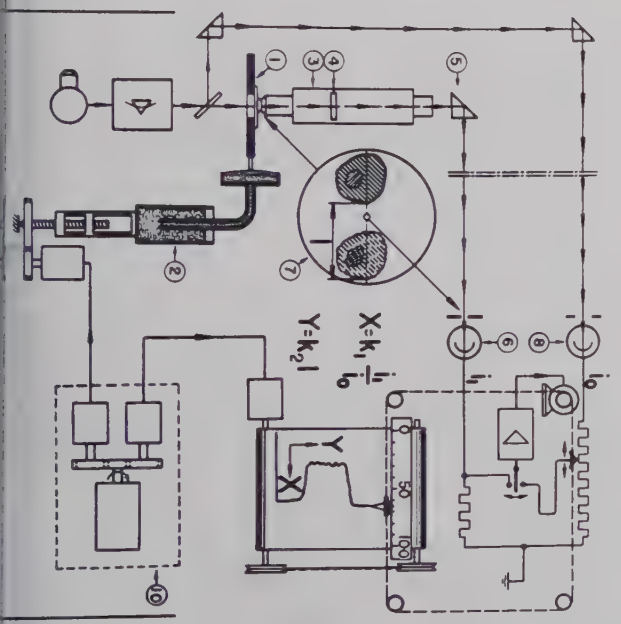


Fig. 8 *b*.

ig. 8.–Principles of *a* spot measurement, and *b* area measurement scanning measurement) *1* object; *2* device for moving the object long the x-axis; *3* and *5* microscope optics; *4* device for moving along he y-axis; *6* and *8* photocells; *7* field of vision in the microscope; oscilloscope; balance indicator for spot measurement; *10* reversible, djustable-speed motor with servo system for scanning measurements.

lissolution of the imbedding medium. Measurements f the distance between the upper and lower surfaces f the section with focusing or stereoscopic methods, or example, are therefore of very limited practical alue. If sections are unavoidable, the method described by Bahr[1] for the preparation of sections of known thickness should be followed. He has also given a method to control the sections for even thickness. By

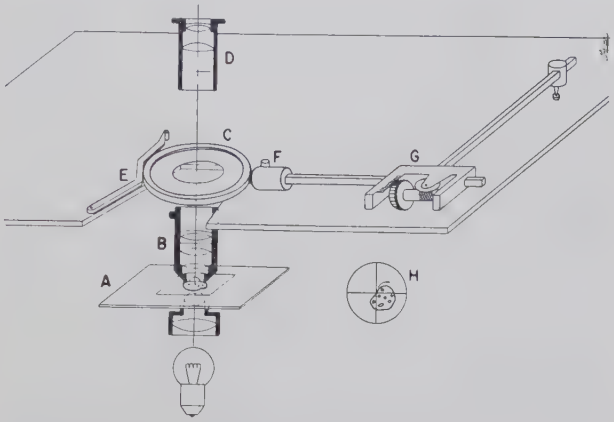


Fig. 9.–Microplanimeter, especially devised for large scale measurements approaching the limit of resolution of the microscope. *A* Object; *B* and *D* microscope optics; *C* movable long-focus lens attached to planimeter *F* and *G*; *E* device permitting reproducibility of starting points; *H* fields of vision in *D*.

working with whole cells by aid of scanning procedures in the way described in the following section, in a great many cases the difficulties in microtome sectioning can be avoided.

(3) *Pretreatment of the Object with Different Procedures for Different Purposes.* The freezing-drying-glycerine method (Caspersson, 1940, for details see [2]) by aid of which the main part of the biological work in the optical region has been done as yet is still by far the best method for pretreatment of material in general because of the almost complete elimination of light losses by refraction and side scattering attainable in many materials. The demands on the quality of the freezing-drying equipment are high. The best results have been obtained by modification of the apparatus of Glick-Malmstrom[3].

A source of error of tremendous significance is the *shrinkage due to fixation.* In the majority of cases the cytochemical study involves a comparison of the contents of a certain substance of two object regions in different functional states, etc. Ordinary fixatives frequently cause 10, 20 or 30% linear shrinkage, and it is not at all uncommon to find that cells of the same type but in different functional states show great differences in the shrinkage occurring in fixation. The most common way to avoid this difficulty is to compare the *total quantity* of absorbing substance *per cell*, i.e. *per metabolic unit*, instead of comparing *concentrations* of absorbing substances. This presupposes the possibility for rapid scanning measurements of relatively large areas in large series. *Elimination of the influence of fixation shrinkage has thus been one of the fun-*

[1] G. Bahr, Exptl. Cell Res. under publication (1954).

[2] T. Caspersson, *Cell Growth and Cell Function* (W. W. Norton & Co., New York, 1950).

[3] G. Moberger, B. Lindström, and L. Andersson, Exptl. Cell Res. *6*, 228 (1954).

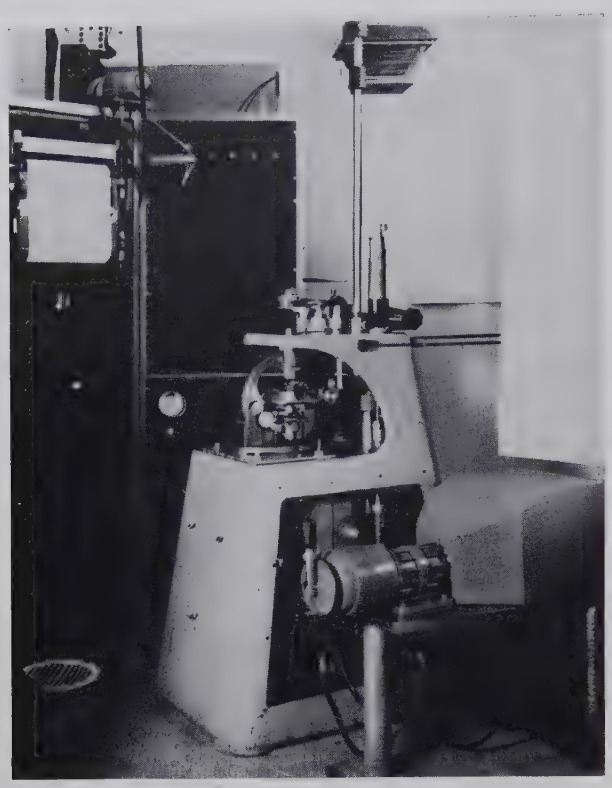


Fig. 10.–Interference microphotometry in the universal microspectrograph (see also Fig. 14).

damental reasons for the development of the rapid scanning apparatus described. This can be carried out either by cutting several sections through the same cell and measurement of the total quantity in all sections or by isolation of the cells from their environment by special procedures and measurement of the total quantity in one operation.

By the former mode of work it is of importance to note also that the *thicknesses of the sections have no influence* and thus the difficulties with microtome sectioning mentioned in the last section are avoided.

When applicable, the work on isolated cells is as a rule much more convenient than on series-sectioned material. Among the preparatory procedures the *isolation procedures* are therefore playing a role of ever increasing importance. Thus far this procedure has been employed in mechanical forms on macroscale or microscale, e.g. microdissection, fractional or gradient centrifugation, and as chemical procedures, e.g. enzymatic methods.

(4) *Dry Weight Determination.* The microradiograms are taken according to the procedure described by LINDSTRÖM[1]. They can subsequently be scanned in the universal-microspectrograph with equipment for visible light. The recording can be analyzed directly in the data analyzer. The scanning interference microphotometry is performed in the same way as the scanning transmission measurement in the visible region (Fig. 10).

[1] B. LINDSTRÖM, Exptl. Cell Res. *6*, 537 (1954); under publication.

The microscope is equipped with interference optics. In the routine work both Baker and Dyson-Cooke optics have proved satisfactory. Here also the recorded curves can be directly treated in the data analyzer. The X-ray

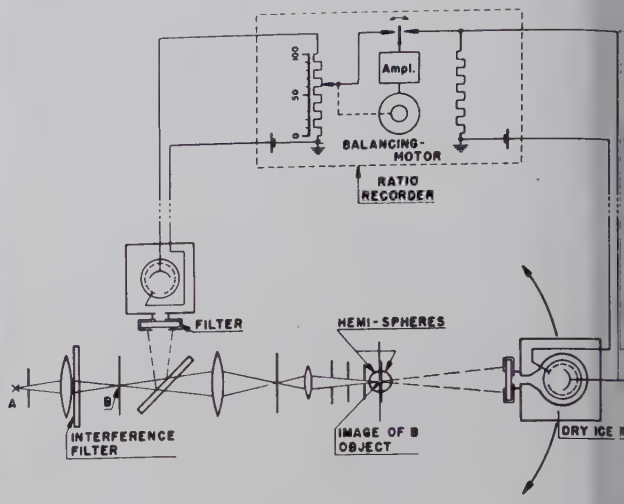


Fig. 11 *a*.

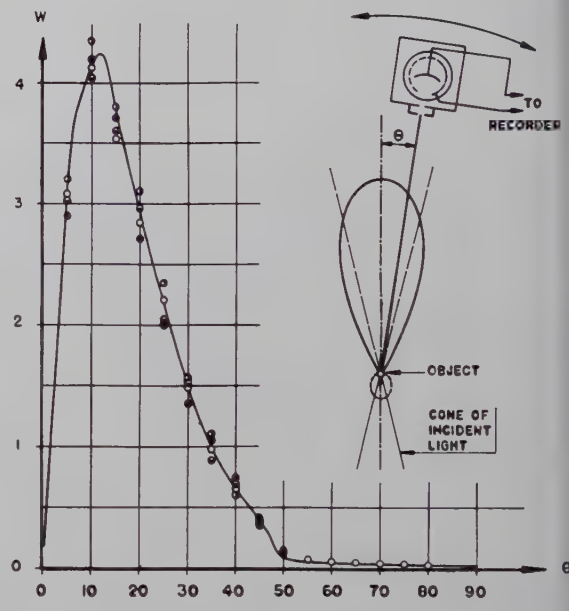


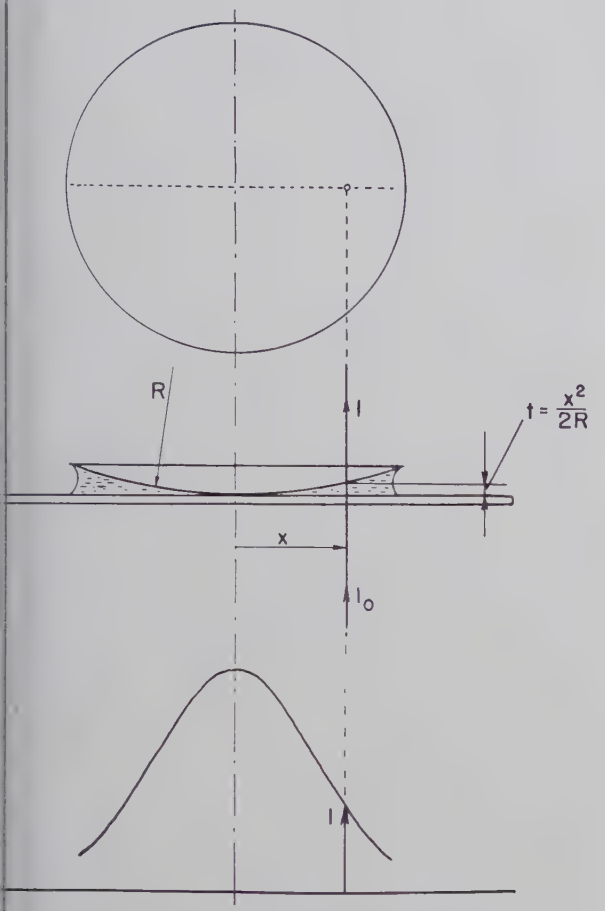
Fig. 11 *b*.

Fig. 11.–Determination of the light energy distribution about a speci men to be measured in the microspectrograph, *a* instrument, and calculated curve from a model object. Points actually measured ar inserted.

and the interference procedures complement each othe in that the X-ray procedure gives greater accuracy ove a much wider quantity range and is practically inde pendent of the pretreatment of the object. The greates advantage of the interference procedure lies in the fac that the preparation need not be dehydrated for meas urement.

(5) *Element Determination.* Microdiagrams taken ac cording to ENGSTRÖM's method can be treated in th universal-microspectrograph in the same manner a that given for mass determination.

5) *Determination of Absorptions in the Optical Spec- Region.* These measurements can be carried out



12.–"Lens cuvette" for routine measurement in viscous solu- s of deviations from LAMBERT-BEER's law at very high concentra- s and at thickness of layers below 10 μ. upper figure illustrates the mode of mea- ment with the scanning microspectro- h. The lower shows a registered curve.

ectly with the standard equipment the universal-microspectrograph presented above. The diagram cifies a number of different acces- ies for specialized fields of appli- ion. Among these is also included rocedure which is not actually spectrographic method, i.e. opti- polarization measurements which easily be performed with the ap- atus. The possibility for measure- nt of ultraviolet dichroism is of rticular importance[1]. It is used to dy, for example, desoxyribonucle- de orientation in the gene-bearing terial. The accessory apparatus in- ated follows the principles des- bed by RUCH[2].

CASPERSSON, Chromosoma *1*, 562 (1940).
RUCH, Exptl. Cell Res. *2*, 680 (1951).

(7) This section refers to the field earlier designated indirect microspectrography.

(8) *Control of Certain Optical Properties of the Object.* The light distribution about the illuminated object must be determined in order to ascertain whether the aperture of the measuring apparatus is sufficient for

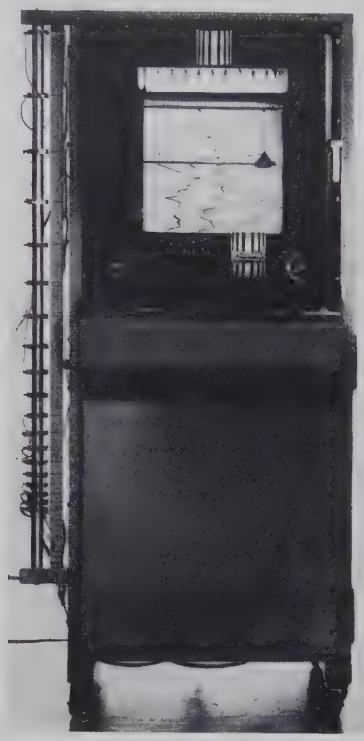


Fig. 13*a*.

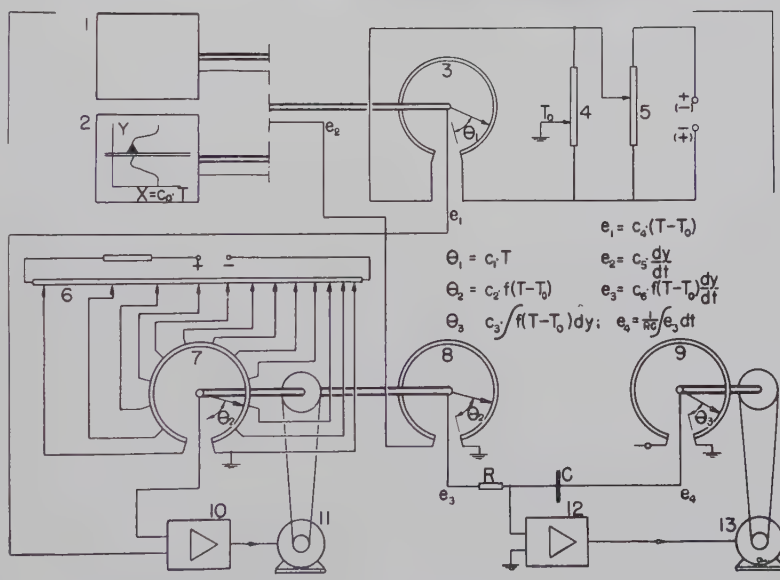


Fig. 13.–Automatic data analyzer. *a* Photograph; *b* Diagram; *1* and *2* represent the two working methods: *1* direct connection to the microspectrograph (possibly operating as an interference microphotometer), and *2* analysis of a previously recorded curve. *3*, *4*, *5*, *6*, *7*, *8*, *10*, and *11* Function transforming circuit. The function according to which the transformation is to be made is set on *6*, *9*, *12*, and *13* Integrating circuit. The split-phase motors *11* and *13* belong to the X_1–X_2 recorder (not included in the diagram) which simultaneously registers the transformed function Θ_2 and its integral Θ_3.

the measurement. SVENSSON[1] has described instrumentation for this purpose. Figure 11 demonstrates the arrangement.

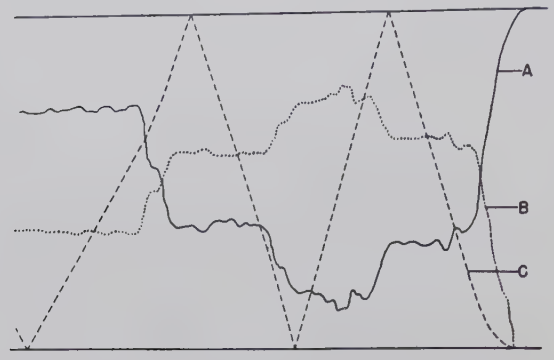


Fig. 14.–Example of analysis in the data analyzer (interference microphotometry). Object as in Figure 4. *A* Curve registered in the universal spectrograph. *B* Transformed function, proportional to the optical path length. *C* Integral of *B*, showing total amount of dry substance passed by the scanning beam (ordinate broken to increase accuracy in reading).

(9) *Measurement of the Optical Properties of the Substances in the Object.* In the literature data are rarely available on the validity of LAMBERT-BEER's law for high concentrations under the conditions prevailing in cell material. Consequently, for each special substance type to be investigated such measurement must be performed. For this purpose a special device, the "lens cuvette", has been developed (SVENSSON[2]) for the universal-microspectrophotometer (see Fig. 12). With the high extinctions and high concentrations existing in certain cases there is a risk that anomalous dispersion may occur as a course of error. A procedure for measurement of the refractive index in substances with high absorption, aimed especially at substances of importance to spectrography has also been developed by SVENSSON[3].

(10) *Automatic Data Analyzer Registering Function Transformer with Integrator.* The computer (Fig. 13) most suitable for routine spectrographic work has been designed by LOMAKKA[4]. As indicated by the arrows in the diagram, it can be connected directly to the spectrograph and plots then, simultaneously with the recording in the spectrograph of the light transmission, a curve transformed according to an arbitrary function and the integral of the curve. In many cases it is more expedie for technical reasons to perform the curve analys after the actual measuring operation. Therefore, th analyzer was designed so that a previously recorde transmission curve could be placed in the analyzer an analyzed afterwards. Since the conversion can be ca ried out according to an adjustable function, the dat analyzer can be used for measurements in both optic and X-ray regions and for interference measuremen (Fig. 14).

As may be seen from the diagram, the equipmer necessary for more general quantitative microspectr graphic work is relatively complex. The basic equipmer of the model of the universal-microspectrograph d scribed above is, however, so versatile in applicatio that in conjunction with ordinary high class histolog laboratory equipment it can be employed for wor within a comparatively broad cytochemical field. can be used directly as an ultraviolet microscope an after insertion of suitable optics, as a phase contrast an interference microscope. It is also suitable for th usually very comprehensive photographic or visu preliminary investigations that precede each individu measurement.

Zusammenfassung

Das heterogene, durch die strukturelle Organisatio der Zelle bedingte Reaktionsmilieu ist für eine so gros Zahl von Stoffwechselprozessen von entscheidender B deutung, dass die Ausarbeitung quantitativer, zytoch mischer Methoden für den Grössenordnungsbereich dies Zellstrukturen unumgänglich wurde. Die Entwicklu solcher allgemeinerer Methoden ist notwendigerwei eine instrumentell komplexe und arbeitsreiche Aufgab Sie kann nur in Angriff genommen werden, wenn dab Richtlinien befolgt werden, die gewisse Erwartungen erfüllen versprechen sowohl in bezug auf Breite der Mö lichkeiten als auch auf Genauigkeit und eine ganze A zahl anderer Voraussetzungen.

Diese Bedingungen werden im einzelnen besproche und es wird gezeigt, dass die Ultramikrospektrograph ganz allgemein so viele Voraussetzungen erfüllt und ein so weiten Anwendungsbereich eröffnet, dass es berec tigt erscheint, breite Arbeitslinien auf diesem Gebi zu entwickeln.

Eine zu diesem Zweck im Institut für Zellforschung Stockholm entwickelte Instrumentation wird in ihr Grundzügen beschrieben[1].

[1] G. SVENSSON, Exptl. Cell Res. *6*, 529 (1954).
[2] G. SVENSSON, under publication (1954).
[3] G. SVENSSON, under publication (1954).
[4] G. LOMAKKA, Exptl. Cell Res. *7*, 603 (1954).

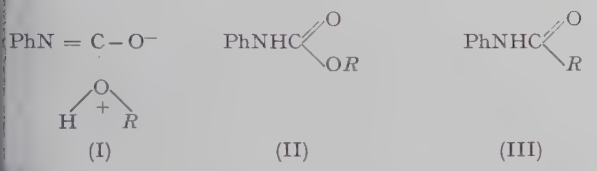
[1] The development of the program above described has be supported during the course of several years by the Nobel, Rockefell Wallenberg and Anderson Foundations, the Swedish State Natu Science Research Council and the Swedish Anticancer Society.

Brèves communications - Kurze Mitteilungen
Brevi comunicazioni - Brief Reports

s auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

The Structure of Phenylurethanes

Phenylurethanes are formed by the interaction of enols (or alcohols) with phenyl*iso*cyanate and it has ng been known[1] that this reaction can be reversed by ating the urethane. Recently ILLARI and MARENGHI d co-workers[2] have studied the thermal decomposi-n of various phenylurethanes and they concluded that general the products obtained by interaction of enols and phenyl*iso*cyanate are *not* phenylurethanes t "molecular complexes", probably of type (I). BAKER and GAUNT[3] have shown that the uncatalysed action between phenyl*iso*cyanate and alcohols pro-eds via an intermediate complex of this type.) On the her hand the products obtained from β-naphthol and genol were considered to have the authentic urethane ructure (II) since they gave rise, on pyrolysis, to rbanilide and a diaryl carbonate along with some enyl*iso*cyanate and the original phenol. The basis on hich ILLARI *et al.* assign structures (I) or (II) to enyl*iso*cyanate–phenol reaction products is very adequate and their formation in pyridine solution[4] ppears to exclude structure (I) (cf. BAKER and GAUNT[5]).



(I) (II) (III)

We have now examined the infra-red spectra of a mber of the compounds prepared by ILLARI *et al.* nilides (III) show their carbonyl stretching band in the gion 1660–1680 cm^{-1} (THOMPSON and RICHARDS[6]). mparison of the carbonyl frequencies of simple ketones d esters indicates that an oxygen atom adjacent to e C=O group raises its frequency about 30–40 cm^{-1}. herefore if phenylurethanes have structure (II) a car-nyl frequency of 1690–1720 cm^{-1} would be anticipated. n the contrary structure (I) would not be expected to ve any band in this region except a C=N band prob-ly between 1630 and 1670 cm^{-1}. The following values ere found.

In addition all the spectra showed a band near 1530 cm^{-1} hich is characteristic of the –CO–NH– group. These gures agree with those of THOMPSON, NICHOLSON, and SHORT[1] and provide clear evidence for the accepted structure (II) of phenylurethanes.

Phenylurethane (solid)	cm^{-1}
Menthol	1697
tert. Butyl alcohol	1690
Phenol	1715
β-Naphthol	1720
o-Nitrophenol	1705
	1728
p-Nitrophenol	1715

N. F. HAYES, R. H. THOMSON, and M. ST. C. FLETT.

Chemistry Department, The University, Old Aberdeen, Scotland, and Imperial Chemical Industries Ltd., Dyestuffs Division, Hexagon House, Blackley, Manchester 9, England, July 27, 1954.

Zusammenfassung

Die Infrarotspektren verschiedener Phenylurethane zeigen, dass diese die angenommene Struktur (II) besitzen und nicht molekulare Komplexe darstellen, wie ILLARI *et al.*[1] annehmen.

[1] R. LEUCKART and M. SCHMIDT, Ber. dtsch. chem. Ges. *18*, 2339 (885).

[2] G. ILLARI, I. MARENGHI, and E. TARANTELLI, Ann. Chim. ppl. Roma *43*, 55 (1953). – G. ILLARI, I. MARENGHI, and A. STUANI, nn. Chim. Appl. Roma *43*, 744 (1953).

[3] J. W. BAKER and J. GAUNT, J. Chem. Soc. *1949*, 19.

[4] G. ILLARI, I. MARENGHI, and A. STUANI, Ann. Chim. Appl. oma *43*, p. 744. (1953).

[5] J. W. BAKER and J. GAUNT, J. Chem. Soc. *1949*, 9.

[6] H. W. THOMPSON and R. E. RICHARDS, J. Chem. Soc. *1947*, 1252.

[1] H. W. THOMPSON, D. L. NICHOLSON, and L. N. SHORT, Farad. Soc. Discussions *9*, 229 (1950) (The senior author has confirmed that the figure 7000 in Table II is an error and should be 1700.).

A New Synthetic Sulfur-Containing Amino Acid: S-Aminoethylcysteine

The mechanism by which the organism acquires the mercaptoethylamine for the synthesis of CoA is still completely unknown. While we know that pantothenic acid, necessary for such a synthesis, must be brought to the organism from outside, we have no information indicating that mercaptoethylamine too must be obtained from the diet.

It is highly probable therefore that mercaptoethylamine is synthesized by the animal in one of the following ways:

(1) decarboxylation of cystine or cysteine; (2) dismutation of cystamine disulfoxyde; (3) transulfuration from cysteine or homocysteine to ethanolamine. The last mechanism might be of real interest after the discovery of biological transulfuration reactions from homocysteine to serine with the production of cysteine[1].

[1] V. DU VIGNEAUD, G. B. BROWN, and J. P. CHANDLER, J. Biol. Chem. *143*, 59 (1942). – F. BINKLEY, W. P. ANSLOW, and V. DU VIGNEAUD, J. Biol. Chem. *143*, 559 (1942). – F. BINKLEY, J. Biol. Chem. *155*, 39 (1944).

In order to have some indication of the existence of a biological mechanism of transulfuration between a sulfur-containing aminoacid and ethanolamine, it was found necessary to prepare the hypothetical intermediate: aminoethylcysteine (I) and its homologue aminoethylhomocysteine. We have started with the

$$NH_2CH_2{\cdot}CH_2{-}S{-}CH_2{\cdot}CHNH_2{\cdot}COOH \qquad (I)$$

synthesis of the cysteine derivative in order to have information on such types of synthesis and because this substance is more easily obtainable.

S-aminoethylcysteine monohydrochloride recrystallized with acetone from an hydroalcoholic solution (about 150 ×).

Experimental. 5 g of L-cysteine hydrochloride were dissolved in 10 ml of bidistilled water through which a flow of nitrogen was run for a period of 15 min. Keeping an atmosphere of nitrogen, 6 g of KOH dissolved in 10 ml oxygen-free water were added. Then by heating on a water bath at 60–70°, 7 g of β-bromoethylamine hydrobromide[1] were added in a period of 10 min. The solution was then left at room temperature under nitrogen for 3 h, neutralized with concentrated HBr and 80 ml alcohol added. After 4–5 h at 0°, a precipitate of KBr was removed and the filtrate was concentrated, on a boiling water bath at reduced pressure, to about 20 ml. 60 ml of alcohol were added and the suspension dissolved by warming and adding a small amount of water. The solution was left overnight at 0° and filtered from a new precipitate of KBr. The supernatant which contained the aminoethylcysteine as a mixed hydrobromide and hydrochloride was passed through a column, 2·5 × 40 cm, of Dowex 50, in the acid form, ground to 80–100 mesh. The column, washed with 500 ml of water, was eluted with NH_3 1 N and the effluent, from the appearance of the ammonia, was collected for a total amount of 200 ml. The collected solution was brought to dryness on a boiling water bath at reduced pressure. The oily residue was dissolved with 20 ml water and neutralized up to a slight acidity with concentrated HCl. Then 80 ml alcohol were added and the crude hydrochloride was precipitated by slowly adding, with vigorous shaking, 100 ml of acetone. In this way an oily precipitate is first obtained which, by shaking and rubbing, solidifies into a semi-crystalline mass. After few days at 0°, the supernatant was removed, the solid mass was mechanically detached from the walls of the container, broken in the presence of acetone, filtered and dried. The crude aminoethylcysteine hydrochloride weighed 4·8 g (75% of the theoretical value); a negative nitroprusside test was obtained before and after treatment with NaCN.

[1] F. Cortese, *Organic Syntheses*, Coll. Vol. II, p. 91.

The recrystallization was complicated by the tendency of the compound to precipitate from aqueous solutions in a semi-oily form carrying water with it. We have obtained good crystallization by the following procedure: 1 g of the above precipitate was suspended in 30 ml 95% alcohol; when boiling, water was added in small portions until a complete solution was obtained. The solution was filtered and acetone was added, while shaking, until a slight permanent turbidity was reached; the solution was clarified by boiling and left at room temperature for a few hours. Acetone was then added in drops until a slight turbidity was obtained again: after rubbing the walls and after a permanence at 0° for 24 h the compound begins to crystallize in the form of needleshaped crystals assembled in rosettes (Figure). The treatment with acetone up to a slight turbidity followed by standing at 0° for several hours, was repeated 4–5 times. Finally the liquid was poured out, the crystals washed with alcohol, collected and dried in a dessiccator; yield 0·5 g. From the mother liquor further 0·15 g of pure crystalline material were obtained following the same treatment for several days.

The analyses made on the crystalline compound gave the following results:

$C_5H_{12}O_2N_2S{\cdot}HCl$	calculated	S 15·97%	N 13·96%
200·69	found	S 15·66%	N 13·40%

The nitrogen was shown to be entirely present as amino nitrogen by the Van Slyke procedure: 98% of the theorical value. M.P. 192°–192·5°; at the microstage with the Kofler apparatus. $[\alpha]_D^{25} = +7{\cdot}2°$: 1% in aqueous solution.

The ninhydrin test and the iodoplatinate test for sulfur-containing amino acids[1] were strongly positive. By paper chromatography only one spot was shown to be present with the following R_f: 0·80 in phenol; 0·19 in collidine-lutidine.

Acknowledgments: The present work was supported by a grant of the Consiglio Nazionale delle Ricerche. We are grateful to Prof. Marotta, Director of the Istituto Superiore di Sanità, for the permission given to us to have the microanalyses made in his Institute by Dr. Marzadro.

D. Cavallini, C. de Marco, B. Mondovì and G. F. Azzone

Institute of Biological Chemistry, University of Rome

June 24, 1954.

Riassunto

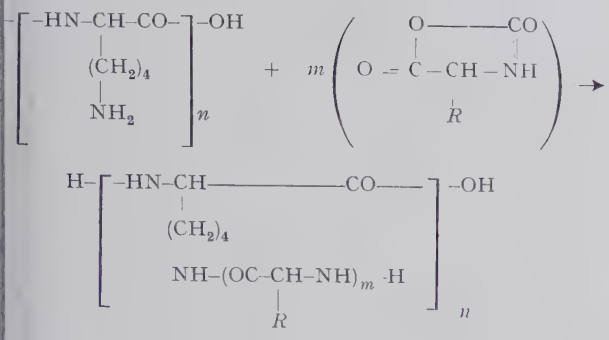
L'aminoetilcisteina, composto intermedio ipotetico di transulfurazione tra cisteina e etanolamina, è stata preparata cristallina sotto forma di monocloridrato trattando la cisteina con bromoetilamina in ambiente alcalino.

[1] H. M. Winegard, G. Toennis, and R. J. Block, Science *108*, 506 (1948).

Branched Polyamino Acids

Most of the known poly-α-amino acids were prepared from N-carboxy-α-amino acid anhydrides, using water or amines as polymerization initiators. The linear polypeptides thus obtained are usually of an average degree of polymerization of 10 to 100. Branched polyamino acids of a considerably higher molecular weight have been prepared by us, using polylysine[1] as a polyvalent amine initiator, according to the following scheme:

[1] E. Katchalski, I. Grossfeld, and M. Frankel, J. Amer. Chem. Soc. *70*, 2094 (1948).



nce N-carboxy-α-amino acid anhydrides react with nines considerably faster than with water, it was ssible to prepare various branched polyamino acids in water-dioxane mixture, under conditions similar to ose used by FRAENKEL-CONRAT[1] for the preparation peptide derivatives of proteins.

As an example of the synthesis of the branched polymino acids, the preparation of poly-(ε,N-poly-DL-anyl)-L-lysine will be described: An ice-cooled solution N-carboxy-DL-alanine anhydride (m.p.45°) (18 g) in anydrous dioxane (250 ml) was added to an ice-cooled lution of poly-L-lysine hydrobromide (*n* average 20[2]) 00 mg) in M/150 phosphate buffer pH 7 (200 ml). The action mixture was left for 24 h in the refrigerator, and en dialysed against water for 5 to 6 days, until the uret and ninhydrin reactions of the dialysate were gative. The solution left in the cellophane bag was conntrated in vacuo and the residue was triturated with etone and dried (5 g). The nondiffusible material thus tained dissolves readily in water and glacial acetic id, and is insoluble in dimethylformamide, pyridine d ethanol. It may be salted out from its aqueous lution by the addition of sodium chloride or ammonium lphate.

A paper chromatogram of an acid hydrolysate of the ndialysable material yielded, after spraying with ninydrin, two spots identified as alanine and lysine. On the her hand, the dialysable material, after hydrolysis and romatographic analysis, yielded alanine exclusively. s polylysine (*n* 20) passed the cellophane membrane nder similar conditions of dialysis, it is evident that all e polylysine served as initiator in the formation of the anched poly-DL-alanine. The absence of a spot corsponding to ε-hydroxy-α-aminocaproic acid on a paper romatogram of the acid hydrolysate of the branched olymer after treatment with nitrous acid, indicates that actically all the ε-amino groups of poly-L-lysine reacted ith the N-carboxy-DL-alanine anhydride to form amide bonds.

A quantitative chromatographic analysis of the drolysate of the branched nondiffusible polymer oved that, on the average, 25 alanine residues are atched to each lysine residue. An independent evaluaon of the average chain length (*m* 23) of the alanine de chains was obtained from the content of the terinal amino and carboxyl groups[2].

Since the diffusible material contained alanine residues, t no lysine, it is obvious that the peptides of this action were formed by water-initiated polymerization. water-initiated linear poly-DL-alanine synthesized nder conditions used for the preparation of the branched olymer—but in the absence of an amine initiator—passd the cellophane membrane to the extent of more than 90% during 6 days. It seems, therefore, that the nondiffusible fraction may contain only a minute amount of linear water-initiated polyalanine.

The electrophoretic mobility of poly-(ε,N-poly-DL-alanyl)-L-lysine (*n* 20, *m* 25) was compared with that of linear poly-DL-alanine (*n* 25), of a linear poly-L-lysine (*n* 20), as well as with that of a mixture of linear polyalanine (*n* 25) and polylysine (*n* 20) in a ratio of 25 alanine residues to one lysine residue. The measurements were carried out on a Whatman No. 1 filter paper in an acetate buffer of pH 3·6 and ionic strength 0·2, at a potential gradient of 10V/cm at room temperature. The polymers were revealed, after 2 h, with ninhydrin. The linear poly-DL-alanine did not move from the origin; the linear poly-L-lysine spread into an elongated spot of 8·6 cm length, towards the cathode; the mixture of the two linear polymers gave a round spot of polyalanine at the origin, and a thin elongated spot corresponding to polylysine. The branched poly-DL-alanine migrated as one circular spot for a distance of 2·8 cm from the origin towards the cathode. The specific viscosity of the branched polymer in water at 20°C was found to be η sp = 0·20. The viscosity of the linear polyalanine (*n* 25) was η sp = 0·030, that of polylysine hydrobromide (*n* 20) was η sp = 0·045, and that of a mixture of the linear polymers in a ratio of 25 alanine residues to one lysine residue was η sp = 0·033. All viscosity measurements were carried out on one per cent solutions. The diffusion coefficient of the linear poly-DL-alanine (*n* 25) in water at 18°C was found to be $D = 28 \cdot 10^{-7}$ cm²/s (*c*, 1 g in 100 ml). A diffusion coefficient of $D = 2 \cdot 10^{-7}$ cm²/s (*c*, 0·8 g in 100 ml glycine buffer of pH 9·0 and ionic strength 0·1) was found for poly-(ε,N-poly-DL-alanyl)-L-lysine (*n* 20, *m* 25) at 18°C. The above physicochemical data show that the properties of the nondiffusible material prepared differ greatly from those of a mixture of polyalanine and polylysine in the same monomer ratio. The relatively low diffusion coefficient and the high specific viscosity of the branched polymer indicate that its average molecular weight is considerably higher than that of the linear poly-amino acids.

Water-soluble poly-(ε,N-polysarcosyl)-L-lysine (*n* 20, *m* 7) was prepared from poly-L-lysine and N-carboxysarcosine anhydride[1], in a similar manner to the branched polyalanine. The dialysable fraction contained sarcosine residues only, while the ratio between sarcosine and lysine residues in the undialysable fraction, was in good agreement with that calculated from end-group analysis[2]. Polymerization of ε,N-carbobenzoxy-α,N-carboxy-L-lysine anhydride[3] in the presence of poly-L-lysine under conditions similar to those given above, yielded a branched polymer from which, after removal of the carbobenzoxy groups with anhydrous hydrogen bromide, a branched basic polyelectrolyte poly-(ε,N-poly-L-lysyl)-L-lysine (*n* 30, *m* 15) was obtained.

The chemical and physicochemical data given above for poly-(ε,N-poly-DL-alanyl)-L-lysine (*n* 20, *m* 25), as well as the fact that also the other water-soluble branched polyamino acids do not pass through the cellophane membrane on dialysis, seem to indicate that the average molecular weight of the branched polyamino acids prepared [38,000 in the case of the poly-(ε,N-poly-DL-alanyl)-L-lysine (*n* 20, *m* 25) described] lies in the range of that of proteins. Such water-soluble polymers may be of considerable interest in the study of multichain polymers,

[1] H. FRAENKEL-CONRAT, Bioch. bioph. Acta *10*, 180 (1953).
[2] M. SELA and A. BERGER, J. Amer. Chem. Soc. *75*, 6350 (1953).

[1] F. SIGMUND and F. WESSELY, Z. physiol. Chem. *157*, 91 (1926).
[2] M. SELA and A. BERGER, J. Amer. Chem. Soc. *75*, 6350 (1953).
[3] E. KATSCHALSKI, I. GROSSFELD, and M. FRANKEL, J. Amer. Chem. Soc. *70*, 2094 (1948).

of branched polyelectrolytes, and of proteins. Some of these branched peptides might possibly be of use as blood volume expanders.

This investigation was supported by a research grant (PHS G–3677) from the U.S.A. National Institutes of Health, Public Health Service.

M. Sela and E. Katchalski

Department of Biophysics, Weizmann Institute of Science, Rehovot, July 17, 1954.

Résumé

Des polyacides aminés ramifiés, avec des poids moléculaires approchant ceux des protéines, ont été préparés par la polymérisation des anhydrides des N-carboxy-acides aminés en présence du polylysine qui sert comme un initiateur polyvalent. Les polypeptides ramifiés suivants sont décrits: poly-(ε, N-poly-DL-alanyl)-L-lysine (*n* 20, *m* 25), poly-(ε, N-polysarcosyl)-L-lysine (*n* 20, *m* 7) et poly-(ε, N-poly-L-lysyl)-L-lysine (*n* 30, *m* 15). Quelques propriétés chimiques et physicochimiques des polyacides aminés ramifiés ont été comparées avec celles de polyacides aminés linéaires preparés par initiation avec un amine monovalent.

Rauwolfia Alkaloids, XVI[1]. Deserpidine, a New Alkaloid from *Rauwolfia canescens*[2]

During the course of an investigation of commercially available Indian *Rauwolfia canescens*, we have isolated a new alkaloid similar in its properties to reserpine. We propose the name deserpidine for this new and pharmacologically interesting alkaloid.

The description of its isolation will be given in a forthcoming experimental paper. Deserpidine crystallizes as colorless prisms or needles, m.p. 228–232°; $[\alpha]_D^{24.5} - 137° \pm 1°$ ($CHCl_3$); ε_{217} max. 64,000; ε_{272} max. 17,750; ε_{244} min. 6,300 (ethanol).

Analysis.
Calculated for $C_{32}H_{38}O_8N_2$: C, 66·42; H, 6·62; N, 4·84; OCH_3 (5), 26·81.

Found: C, 66·42; H, 6·76; N, 4·89; OCH_3, 26·90.

Treatment of deserpidine with sodium methylate[3] gave methyl, 3,4,5-trimethoxybenzoate identified by its m.p. mixed m.p. analysis, and I.R. as well as by its conversion to 3,4,5-trimethoxybenzoic acid. Also isolated from the sodium methylate treatment was the alkaloid acid ester, methyl deserpidate, which gave a crystalline nitrate; m.p. 271–276°.

Analysis. Calculated for $C_{22}H_{28}O_4N_2 \cdot HNO_3$: C, 59·05; H, 6·53; N, 9·39

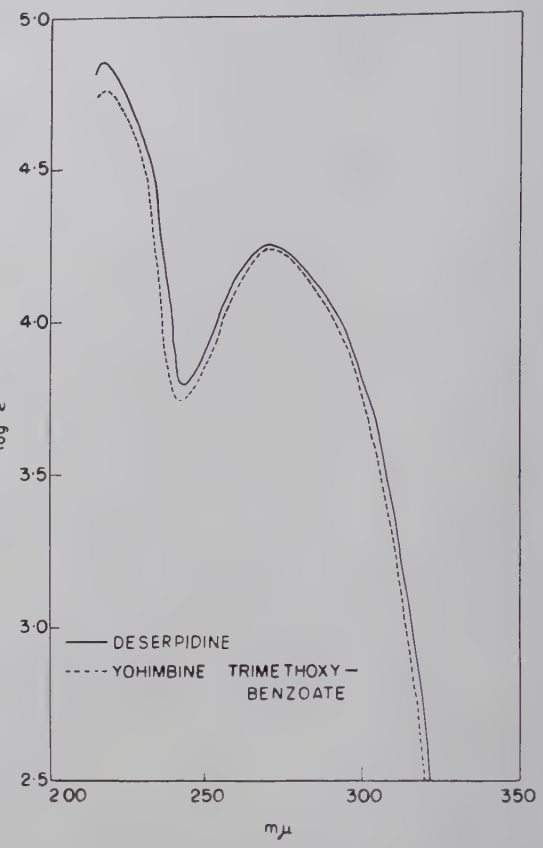
Found: C, 58·73; H, 6·74; N, 9·36.

The tosylate of methyl deserpidate was prepared; m.p. 226–228°.

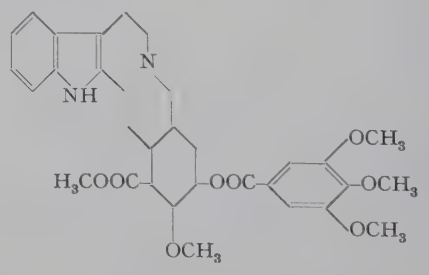
Analysis.
Calculated for $C_{29}H_{34}O_6N_2S$: C, 64·67; H, 6·36; N, 5·20.

Found: C, 64·51; H, 6·42; N, 4·97.

Other esters of methyl deserpidate are being prepared.



On the basis of analytical data, the isolation of 3,4,5-trimethoxybenzoic acid by hydrolysis, interpretation[1] of infrared and ultraviolet absorption spectra, and by analogy to reserpine, the following structure is proposed for deserpidine. Further work on this problem is in progress.



Preliminary pharmacological experiments[2] indicate that deserpidine exhibits both hypotensive and sedative activity comparable to that of reserpine.

[1] Communication XV, C. F. Huebner *et al.*, J.A.C.S. (in press).
[2] From lecture given at Columbia University, New York, January 12th, 1955.
[3] L. Dorfman *et al.*, Helv. chim. acta *37*, 59 (1954).

[1] Absorption in the ultraviolet is similar to that of the 3,4,5-trimethoxybenzoate of yohimbine (see figure). This fact together with the appearance in the infrared absorption spectrum of bands at 730 and 760 K, characteristic of o-disubstituted benzene rings, and the disappearance of the band at 1625 K point to the absence of methoxyl in ring A.
[2] J. A. Schneider, A. J. Plummer, A. E. Earl, W. E. Barrett, R. Reinhart, and R. C. Dibble (in press).

We wish to thank the members of the micro-analytical staff; especially Mrs. Violet Loire for determining the infrared spectra.

E. Schlittler, P. R. Ulshafer, Mary L. Pandow, Regina M. Hunt, and L. Dorfman

Research Department, Ciba Pharmaceutical Products, Inc., Summit, New Jersey, October 12, 1954.

Zusammenfassung

Aus *Rauwolfia canescens* wurde Deserpidin, $C_{32}H_{38}O_8N_2$, isoliert und eine Konstitutionsformel für dieses neue Alkaloid vorgeschlagen.

Zur Frage der thermoelastischen Eigenschaften des Nerven

Während über die Thermoelastizität des Skelettmuskels und anderer Strukturen genaueste Messungen vorliegen[1], ist das entsprechende Verhalten des Nerven bisher niemals Gegenstand einer methodisch zufriedenstellenden Untersuchung gewesen. Zu unsern diesbezüglichen Versuchen wurde ein optisches Lineardilatometer nach Wöhlisch[2] benutzt, welches Interferenzfehler der Apparatur ausschliesst und starke Vergrösserungen ermöglicht (Spiegelablesung mittels Fernrohrs). Die lebensfrisch entnommenen Nerven wurden unter geringer Spannung im Dilatometer befestigt (prozentuale Dehnung $< 5\%$) und nach Abklingen der auftretenden elastischen Nachwirkungen auf ihr thermoelastisches Verhalten geprüft. Der Gesamtnerv zeigt im Temperaturbereich oberhalb 10°C in allen Fällen einen *positiven* linearen Ausdehnungskoeffizienten (l.th.A.K.), dessen ungefährer Wert $\alpha = 10^{-4}$ bis 10^{-5} (pro °C) beträgt. Bei Ausschaltung der thermischen Nachwirkung durch längere Pausen zwischen den Temperaturänderungen (20–30 min) erweist sich diese Längenzunahme des Nerven bei Erwärmung von 17° bis 32°C als voll reversibel (Abb. 1, offene Kreise). Dagegen ist die Reversion unvollkommen, wenn der Nerv stark erwärmt wird oder wenn die Pausen zwischen den Messungen auf 5 min verkürzt werden (Abb. 1, gefüllte Kreise). Für den Froschnerven zeigen sich zwischen 17° und 44°C regelmässig zwei verschiedene l.th.A.K.: ein geringer bei Temperaturen unterhalb 33°C und ein grösserer oberhalb dieses Wertes (Abb. 1, gefüllte Kreise). Wie beim Froschnerven, wird auch beim Warmblüternerven die Reversion der thermischen Längenänderung verzögert bzw. verhindert, wenn die Erwärmung eine bestimmte Temperatur überschreitet. So zeigt der Nerv nach längerer Erwärmung auf 61°C bei Abkühlung trotz längeren Pausen zwischen den Messungen keine Neigung zur Wiederverkürzung (s. Abb. 2, gefüllte Kreise), während im anderen Falle bei einer Maximaltemperatur von 38°C eine deutliche Tendenz zur Verkürzung besteht (Abb. 2, offene Kreise).

Man muss sich fragen, ob bei dem Gehalt des Nerven an Bindegewebselementen dieser positive l.th.A.K. als eine Eigenschaft der Faserstruktur anzusehen ist. In den Versuchen am Muskel war diese Frage leicht zu entscheiden, da der dort gefundene negative l.th.A.K. nicht durch das Bindegewebe hervorgerufen sein kann, welches einen positiven l.th.A.K. zeigt[1]. In der Tat zeigen in unseren Versuchen Präparate mit intaktem Epi- und Perineurium die höchsten Werte für den l.th.A.K. ($\alpha = 1{,}6 \times 10^{-4}$, Abb. 2, offene Kreise), während wir den geringsten Wert immer dann finden, wenn beide Bindegewebsscheiden vorher präparatorisch entfernt sind ($\alpha = +\ 1{,}0 \times 10^{-5}$, Abb. 2, gefüllte Kreise). Mittlere

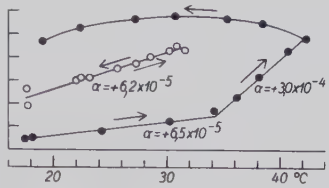


Abb. 1. Thermische Längenänderung zweier Froschnerven (N. glossopharyngeus = offene Kreise, N. ischiadicus = gefüllte Kreise). Veränderung der Nervtemperaturen in Pfeilrichtung. Vergrösserung 427. Ordinate: Längenänderung, nicht maßstäblich.

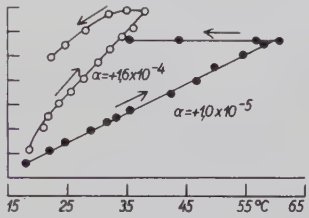


Abb. 2. Wie in Abbildung 1, doch für Warmblüternerven (Katze, N. gastrocnemius). Offene Kreise: Nerv mit Epi- und Perineurium; gefüllte Kreise: Präparation mit nur wenigen Fasern ohne Epi- und Perineurium.

Werte ergeben sich, wenn nur das Epineurium entfernt ist, während das Perineurium intakt bleibt ($\alpha = +\ 6{,}2 - 6{,}5 \times 10^{-5}$, Abb. 1). Zusatz auch grösserer Mengen der Bindegewebe abbauenden Hyaluronidase setzt den schwach positiven l.th.A.K. von Nervenfaserbündeln nach präparatorisch entfernten Epi- und Perineurium nicht weiter herab, so dass dieser als Eigenschaft der Nervenfaser und nicht des longitudinal angeordneten äusseren Endoneuriums angesprochen werden muss.

E. Dodt

Physiologisches Institut der Universität Bern, den 1. Oktober 1954.

Summary

The thermo-elastic properties of nerve have been studied by measurements of the change in length caused by changes in temperature. The thermal coefficient (per °C) of linear expansion, always positive in sign, is of the order of 10^{-4} for intact nerve and 10^{-5} for dissected nerve.

[1] K. Krnjević, Quart. J. exptl. Physiol. *39*, 55 (1954).

On the Incorporation of Radiosulfate in the Cartilage

Dziewiatkowski *et al.*[1] showed that radioactive sulfur administered intraperitoneally to 7 days old rats, becomes fixed in a high proportion in the hyalin cartilage

[1] E. Wöhlisch und G. Clamann, Z. Biol. *91*, 399 (1931).
[2] E. Wöhlisch, Z. Biol. *91*, 137 (1931).

[1] D. D. Dziewiatkowski, R. E. Benesch, and R. Benesch, J. biol. Chem. *178*, 931 (1949).

of the skeletal anlagen. Dziewiatkowski[1] and later Boström[2] gave the further proof that the radiosulfate is incorporated in the chondroitinsulfuric acid; uptake of radiosulfate was also demonstrated in a mucopolysaccharide fraction isolated from rats skin[3]. Besides, Boström and Månsson[4] have shown that the radioactive sulfur is taken up by slices of hyalin cartilage (e.g., fresh rib cartilage of adult calves, cats and guinea pigs) suspended in Krebs solution and that it is introduced into the chondroitinsulfuric acid during its synthesis: the possibility that in the absence of an enzyme system an exchange reaction of the sulfate group might occur, was disposed of. According to Boström and Månsson[5], exchange does not take place even in solutions of pure chondroitinsulfuric acid alone.

The data presented here offer evidence that also in the living animal the fixation of radiosulfur to cartilage depends upon processes of synthesis and that a simple exchange of radiosulfate with the sulfate group of the chondroitinsulfuric acid does not occur to any autoradiographically detectable extent.

The following results are part of an autoradiographic study on the distribution of radiosulfur in the differentiation and growth of cartilage in chicken embryos. The technique of the experiments and a summary of the main results have been presented elsewhere[5]; here we only want to stress the fact that in given regions of the cartilage in which large amounts of chondroitinsulfuric acid are available for sulfate exchange but no actual increment of the matrix occurs, no fixation of radiosulfur takes place.

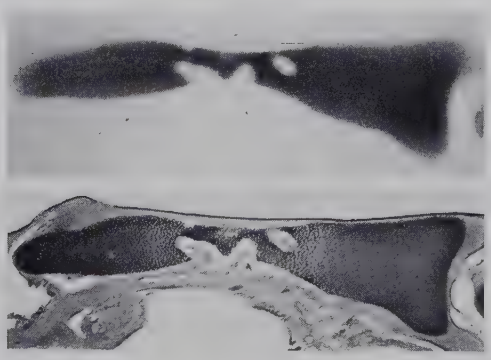


Fig. 1.–14 days chick embryo, 10 days after radiosulfate treatment; second phalanx of the 2nd digit of the foot. 21 ×.

By treating chicken embryos of various ages with small amounts of S^{35}-labeled sodium sulfate (e.g., 5 to 10 μC), different results are obtained according to whether the embryos are fixed from 2 to 10 h or from 5 to 10 days after the treatment. In short term experiments, only the matrix which formed or underwent increment during the period of treatment, shows a varying degree of radioactivity. In long term experiments, especially if the treatment with radiosulfate is started before the beginning of chondrification of the cartilaginous anlagen (viz., in the 4th or 5th day of incubation), the whole cartilage of the skeletal pieces appears radioactive (Fig. 1); however, differences in the degree of radio-

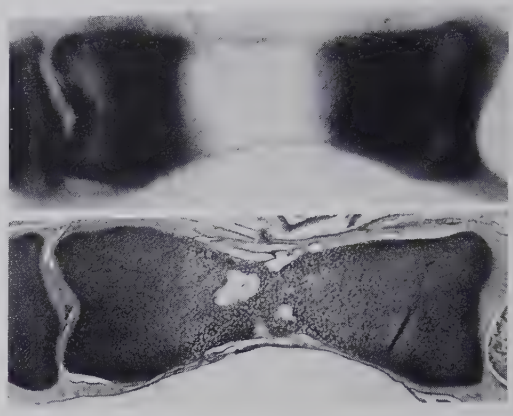


Fig. 2.–14 days chick embryo, 10 h after S^{35} treatment; first phalanx of the 3rd digit of the foot. 25 ×.

activity are apparent between different cartilaginous segments or from region to region of the same skeletal element, according to the degree of their histological differentiation. In other words, while the short term experiments indicate the site and the amount of the chondroitinsulfuric acid which was synthesized during the few hours of treatment, the long experiments give, so to speak, the result of the algebraic sum of successive variations of the synthesis in the same site during a long period of time.

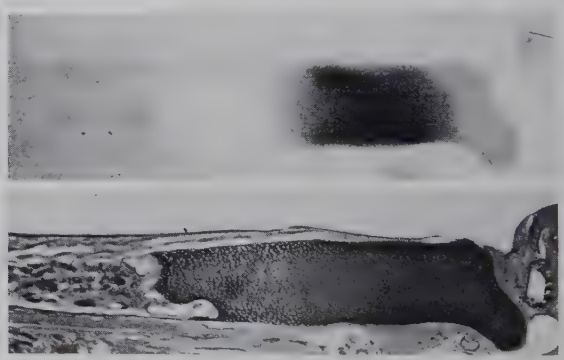


Fig. 3.–14 days chick embryo, 2·30 h after S^{35} treatment; second metatarsal. 21 ×.

In the cartilaginous anlage of bones, the synthesis of chondroitinsulfuric acid, as revealed by radiosulfur uptake, undergoes with time remarkable quantitative variations parallel to changes of the amount and of the basophilia of the matrix (Amprino, l.c.). Just before the perichondral bone ring is laid down, the radioactivity of the middle third of the diaphyseal cartilage falls quite rapidly in comparison with that of other regions of the same anlage; and it becomes practically zero when the inner resorption of cartilage starts (short term experiments). From this moment up to the complete destruction of the diaphyseal cartilage, no uptake of radiosulfate was ever detected in the cartilage of the middle third of the diaphysis in 12 to 20 days embryos fixed from 2 to 12 h after treatment with labelled sulfate; at the same time the radiosulfate uptake is extremely high in the parts of the cartilaginous diaphysis next to the metaphyseal regions and in the metaphyseal cartilage proper (Fig. 2 and 3). On the other hand, it should be recalled that, in birds' osteogenesis, the diaphyseal

[1] D. D. Dziewiatkowski, J. biol. Chem. *189*, 187 (1951).
[2] H. Boström, J. biol. Chem. *196*, 477 (1952).
[3] H. Boström and S. Gardell, Acta Chem. Scand. *7*, 216 (1953).
[4] H. Boström and B. Månsson, J. biol. Chem. *196*, 483 (1952).
[5] R. Amprino, C. r. Ass. Anat., 41e Réun., Genova 1954 (in press); Atti Acc. naz. Lincei, S. VIII, V. 16, 781 (1954).

cartilage does not undergo calcification before it is gradually absorbed; this cartilage maintains throughout its structural characteristics with large cells and intensely basophylic and metachromatic matrix.

It therefore seems reasonable to conclude: (*a*) that synthesis of chondroitinsulfuric acid no longer occurs in this region, and (*b*) that the sulfate group of the previously formed chondroitinsulfuric acid does not exchange with the radiosulfate of the blood and of the interstitial fluid.

R. Amprino

Institute of Human Anatomy, University of Turin, August 31, 1954.

Riassunto

Con metodo autoradiografico di contrasto dopo trattamento di embrioni di pollo con radiosolfato, si è visto che durante un periodo relativamente lungo dello sviluppo degli abbozzi delle ossa lunghe non si produce sintesi di solfato di condroitina nella cartilagine della regione diafisaria. In tale segmento di cartilagine non si manifesta neppure scambio ionico fra il solfato dell'abbondante acido condroitinsolforico della sostanza fondamentale ed il radiosolfato presente nel sangue e nella linfa interstiziale del connettivo.

Vergleichende Untersuchungen über die hypertensive Wirkung von Aldosteron und Desoxycorticosteron

Von den bis heute bekannten Hormonen der Nebennierenrinde besitzt Aldosteron die stärkste Wirkung auf die Natrium- und Chlorausscheidung. Sowohl im akuten Versuch an der Ratte[1] als auch im Lebenserhaltungstest am nebennierenlosen Hund[2] ist es in dieser Hinsicht etwa 25mal wirksamer als Desoxycorticosteron, und bei Patienten mit Nebennierenrindeninsuffizienz liess sich eine ähnliche Wirkungsrelation zwischen den beiden Steroiden feststellen[3]. Aldosteron unterscheidet sich aber auch qualitativ von Desoxycorticosteron, das an der nebennierenlosen Ratte relativ stärker wasserretinierend wirkt[1] und bei Überdosierung im akuten Versuch am nebennierenlosen Hund zu deutlicher Wasser- und Kochsalzretention führt[2].

Für die Charakterisierung der Wirkungsqualitäten von Aldosteron sind aber neben den im akuten oder kurzdauernden Versuch erhobenen Befunden die bei chronischer Anwendung relativ hoher Dosen auftretenden Symptome von besonderer Wichtigkeit. Desoxycorticosteron führt bei chronischer Überdosierung und gleichzeitiger Gabe von Kochsalz an der durch Nebennierenexstirpation und einseitige Nephrektomie «sensibilisierten» Ratte zu den bekannten Nebenwirkungen in Form von Wasser- und Kochsalzretention, Hochdruck, perivaskulären Infiltraten und Nierenschädigungen[4]. Es war daher abzuklären, ob Aldosteron bei gleicher Versuchsanordnung in Dosen, die im Hinblick auf die Natrium- und Chlorretention als analog zu beurteilen sind, ähnliche Veränderungen hervorruft.

Methode. Männliche weisse Ratten im Gewicht von 140 bis 150 g wurden doppelseitig adrenalektomiert und einseitig nephrektomiert. Vom Tage der Operation an erhielt eine Gruppe von 6 Tieren täglich je 0,04 mg Aldosteron in 0,4 ml Sesamöl, eine Gruppe von 12 Tieren täglich je 1 mg Desoxycorticosteronacetat in 0,5 ml Sesamöl. Die Nahrung bestand aus Trockenfutter (Wayne Lab-Blox «R», Allied Mills, Inc., Chicago) *ad libitum* sowie 1% Kochsalzlösung. Die Menge der getrunkenen Flüssigkeit wurde täglich bestimmt. Das Verhältnis der Dosen von Aldosteron und Desoxycorticosteron wurde auf Grund der Natrium retinierenden Wirkung der beiden Substanzen gewählt, unter der Annahme, dass Aldosteron in dieser Hinsicht 25mal stärker wirkt als Desoxycorticosteronacetat.

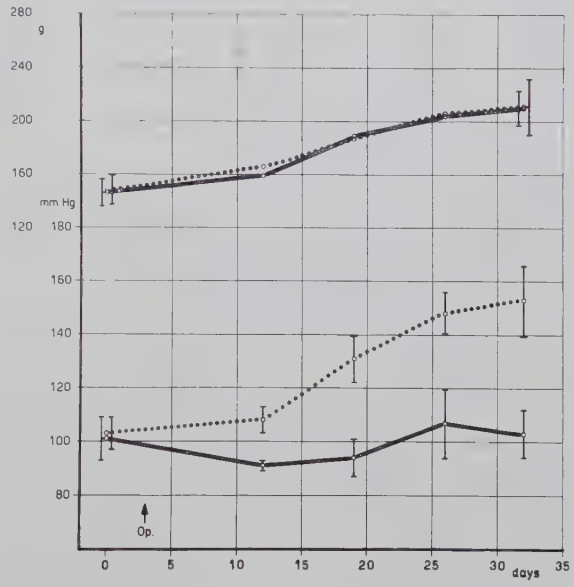


Abb. 1. Verhalten von Blutdruck (untere Kurven) und Körpergewicht (obere Kurven) unter täglicher subkutaner Injektion von 0,04 mg Aldosteron (ausgezogene Linie) und 1 mg Desoxycorticosteronacetat (unterbrochene Linie). – Op.: Doppelseitige Adrenalektomie und einseitige Nephrektomie.

Nach der Operation wurden einmal wöchentlich Blutdruck und Gewicht bestimmt. Die Blutdruckmessung erfolgte mit der von Williams *et al.*[1] angegebenen plethysmographischen Methode in leichter Äthernarkose. Für Blutdruck und Gewicht wurden Mittelwerte und Streuung in den beiden Versuchsgruppen berechnet.

Da nur geringe Mengen von Aldosteron zur Verfügung standen, musste der Versuch nach 29 Tagen abgebrochen werden. Die Tiere wurden mit Äther getötet und Herz, Aorta, Lunge, Leber, Niere, Pankreas, Schilddrüse und Hypophyse histologisch untersucht.

Ergebnisse. Während die mit Desoxycorticosteron behandelten Tiere einen langsamen Blutdruckanstieg aufweisen, der vom 15. Versuchstag an signifikant ist, bleibt der Blutdruck der mit Aldosteron behandelten Tiere während der gesamten Versuchsdauer praktisch unverändert (Abb. 1). Bis zum Versuchsende steigt der Blutdruck-Mittelwert der mit Desoxycorticosteron behandelten Gruppe auf 155 mm Hg an, während derjenige der mit Aldosteron behandelten Gruppe bei 105 mm Hg liegt. Das Durchschnittsgewicht beträgt zu Beginn des Versuches 150 g und nach 4 Wochen 210 g, wobei die

[1] P. Desaulles, J. Tripod und W. Schuler, Schweiz. med. Wschr. *83*, 1088 (1953).

[2] F. Gross und H. Gysel, Acta Endocrinolog. *15*, 199 (1954).

[3] R. S. Mach, J. Fabre, A. Duckert, R. Borth und P. Ducommun, Schweiz. med. Wschr. *84*, 407 (1954). – F. T. G. Prunty, R. R. McSwiney, H. Mills und M. A. Smith, Lancet *267*, 620 (1954).

[4] H. Selye, J. Clin. Endocrin. *6*, 117 (1946); Brit. Med. J. *203*, 1950/51.

[1] J. R. Williams, A. Grollmann und T. R. Harrison, J. clin. Invest. *18*, 373 (1939).

Streuung in der mit Desoxycorticosteronacetat behandelten Gruppe etwas grösser ist (Abb. 1).

Wesentliche Unterschiede ergeben sich zwischen den beiden Versuchsgruppen bei Bestimmung der täglichen Flüssigkeitsaufnahme (Abb. 2). Innerhalb von 5 Tagen nach der Operation verdoppelt sich zunächst bei allen Tieren die tägliche Trinkmenge. Während jedoch bei den mit Aldosteron behandelten Tieren dieser Wert bis zum Versuchsende annähernd konstant bleibt, nimmt die täglich aufgenommene Flüssigkeit unter Desoxycorticosteronacetat kontinuierlich zu und erreicht zu Versuchsende das Vierfache des Anfangswertes. Der gleiche Verlauf der Gewichtskurven in beiden Gruppen spricht jedoch dagegen, dass die gesteigerte Flüssigkeitsaufnahme mit vermehrter Wasserretention einhergeht. In weiteren Untersuchungen wird abzuklären sein, wie sich die Elektrolytkonzentration im Plasma und im Gewebe unter der Einwirkung der beiden Rindenwirkstoffe verhält und welche Auswirkungen die in dieser Hinsicht auftretenden Änderungen haben.

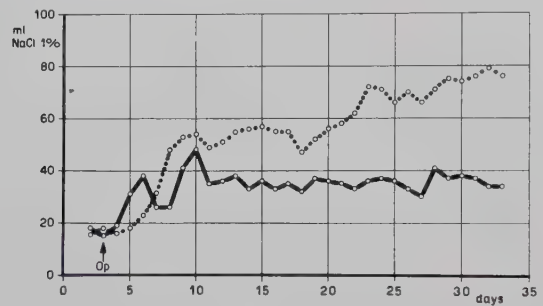


Abb. 2. Durchschnittliche tägliche Trinkmenge der mit Aldosteron (ausgezogene Linie) und der mit Desoxycorticosteronacetat (unterbrochene Linie) behandelten Tiere. – Op.: Zeitpunkt der Operation und Ersatz des Trinkwassers durch 1% Kochsalzlösung.

Bei den mit Desoxycorticosteronacetat behandelten Tieren waren histologisch vereinzelte perivaskuläre Granulombildungen im Myocard und besonders in Niere und Pankreas nachweisbar. Die Nieren weisen ausserdem rundzellige Infiltrate in der mittleren Rindenregion und homogene Zylinder auf. Diese Befunde entsprechen den bei Überdosierung von Desoxycorticosteron beobachteten Veränderungen, zeigten jedoch in ihrer Intensität noch nicht das schwere Bild der Desoxycorticosteron-Kochsalz-Intoxikation, was auf die verhältnismässig kurze Versuchsdauer zurückzuführen sein dürfte. Der Glykogengehalt der Leber war im Vergleich zu unbehandelten Tieren vermindert.

Bei den mit Aldosteron behandelten Tieren liessen sich weder im Myocard noch in der Niere perivaskuläre Granulome oder andere Gefässschädigungen feststellen. Ausser einer geringgradigen Ödembildung im Myokard waren keine pathologischen Veränderungen nachweisbar. Auffallend war das vollständige Fehlen von Glykogen in der Leber.

Obwohl diese bei längerdauernder Anwendung von Aldosteron an der Ratte erhobenen Befunde nur als präliminär anzusehen sind und noch keine endgültigen und verallgemeinernden Schlussfolgerungen über die nach chronischer Überdosierung auftretenden Symptome zulassen, kann doch festgehalten werden, dass Dosen von Aldosteron und Desoxycorticosteronacetat, die im Hinblick auf ihre Natrium-retinierende Wirkung als gleich wirksam anzusehen sind, nicht zu identischen Veränderungen führen. Während Desoxycorticosteronacetat Blutdruckanstieg, Gefäss- und Bindegewebsveränderungen und Nierenschäden hervorruft, bleibt unter Aldosteron der Blutdruck unverändert und auch histologisch sind keine Schädigungen nachweisbar. In weiteren Versuchen wird abzuklären sein, welche Nebenwirkungen dem Aldosteron bei höherer Dosierung oder bei länger dauernder Anwendung zukommen und welche Beziehungen zu den nach Überdosierung von Desoxycorticosteron auftretenden Veränderungen bestehen.

F. Gross, P. Loustalot und R. Meier

Wissenschaftliche Laboratorien der Ciba-Aktiengesellschaft Basel, den 28. Oktober 1954.

Summary

In the adrenalectomized and unilaterally nephrectomized rat an investigation has been carried out on the influence of a four weeks' treatment with aldosterone and desoxycorticosterone-acetate in doses which are equieffective concerning sodium retaining capacity. Desoxycorticosterone-acetate produced hypertension, perivascular granuloma and renal lesions, whereas under the influence of aldosterone the blood pressure remained normal and no histopathological alterations could be found. Towards the end of the experiment the animals treated with desoxycorticosterone-acetate took up twice as much drinking fluid as the animals treated with aldosterone. Although the results obtained so far are only of a preliminary character it is obvious that aldosterone in doses which are equieffective concerning sodium retention does not produce the same side effects as desoxycorticosterone-acetate.

Vergleich der Wirkung des Aldosterons auf das Fremdkörpergranulom der Ratte mit derjenigen von Cortexon, Corticosteron, Cortison und Hydrocortison

Nebennierenrindensteroide besitzen sowohl bei lokaler als auch allgemeiner Applikation eine Wirkung auf die Entwicklung des Fremdkörpergranuloms[1]. Cortison und Hydrocortison haben eine ausgesprochen hemmende Wirkung in den beiden Anwendungsformen, während Corticosteron und Cortexon eine hemmende Wirkung nur bei lokaler Applikation haben.

Nachdem in unseren Laboratorien die Isolierung eines neuen Nebennierensteroids, des Aldosterons[2], gelungen war, welches, obgleich etwa 25–30mal wirksamer als Cortexon[3], in vieler Hinsicht diesem ähnliche Wirkungen besitzt, schien es von besonderem Interesse, die Wirkung dieses Hormons auf die Granulomentwicklung zu untersuchen. Es schien für die Prüfung der zur Verfügung stehenden kleinen Mengen besonders die lokale Anwendung geeignet. Es wurden solche Dosen des Hormons ausgewählt, von denen im Vergleich zur Wirksamkeit von Cortexon, Hydrocortison und Cortison eine Wirkung erwartet werden konnte, falls diese in analoger Weise wie bei den genannten Hormonen vorhanden wäre.

[1] R. Meier, F. Gross und P. Desaulles, Klin. Wschr. *29*, 653 (1951). – R. Meier, F. Gross, P. Desaulles und B. Schär, Bull. Schw. Akad. Med. Wiss. *8*, 34 (1952).

[2] S. A. Simpson, J. F. Tait, A. Wettstein, R. Neher, J. v. Euw und T. Reichstein, Exper. *9*, 333 (1953).

[3] P. Desaulles, J. Tripod und W. Schuler, Schw. med. Wschr. *83*, 1088 (1953). – F. Gross und H. Gysel, Acta Endocrinol. *15*, 199 (1954).

Substanz	Dosis mg pro Tier lokal	Tierzahl	Körpergewichtszunahme in g in 6 Tagen		Granulomgewebebildung (mg) nach 6 Tagen	
			absolut	Differenz	absolut S.E.	Differenz
Aldosteron	Kontrolle	18	22	—	387 ± 23,0	—
	0,05	6	31	+ 9	431 ± 20,5	+ 44
	0,10	6	29	+ 7	447 ± 23,6	+ 60
	0,20	5	34	+12	398 ± 17,1	+ 11
Cortexon (freier Alkohol)	Kontrolle	24	23,5	—	394 ± 19,7	—
	0,10	18	20	− 3,5	384 ± 19,0	− 10
	1,0	18	28	+ 4,5	281 ± 16,8	−113
	5,0	8	31	+ 7,5	237 ± 18,9	−157
	10,0	8	27	+ 3,5	178 ± 12,1	−216
Corticosteron (freier Alkohol) . . .	Kontrolle	12	20	—	395 ± 24,0	—
	0,05	6	25	+ 5	406 ± 23,0	+ 6
	0,10	6	30	+10	384 ± 15,3	− 11
	1,0	6	26	+ 6	244 ± 12,2	−151
Cortison (freier Alkohol)	Kontrolle	18	23,6	—	396 ± 15,8	—
	0,05	12	22	− 1,4	376 ± 18,8	− 20
	0,10	12	15	− 8,6	336 ± 23,5	− 60
	1,0	12	12	−11,4	241 ± 14,5	−155
Hydrocortison (freier Alkohol) . .	Kontrolle	12	24,5	—	405 ± 24,3	—
	0,05	6	24	− 0,5	372 ± 14,9	− 33
	0,10	6	19	− 5,5	291 ± 17,4	−114
	1,0	6	14	−10,5	224 ± 13,4	−181

Methode. Die Versuche wurden an männlichen Ratten durchgeführt. Die Tiere wurden beidseitig 6 Tage vor Versuchsbeginn unter Ätherrausch epinephrektomiert und mit 1 mg/kg subkutan täglich Cortexon acetat (Percorten Ciba) in Öl und 1 % Salzwasser als Trinkwasser am Leben erhalten. Ihr Gewicht betrug zu Versuchsbeginn 100–110 g. Für jede Versuchsgruppe wurden 6–18 Ratten benutzt. Zu Versuchsbeginn wurden beidseitig subkutan Wattepresslinge unter Ätherrausch implantiert, nach der von uns schon beschriebenen Technik[1].

Bei dieser Versuchsanordnung ist zu berücksichtigen, dass es sich um nebennierenlose Tiere handelt, die mit einer Erhaltungsdosis Cortexon acetat am Leben erhalten wurden. Es ist somit bei der Beurteilung des Wirkungstypus der geprüften Hormone zu beachten, dass diese ihre Wirkung unter diesen Umständen zum Teil als Synergisten bzw. Antagonisten des Cortexon ausüben, wodurch der Wirkungstypus in gewisser Weise bestimmt sein könnte.

Resultate. Die Resultate der Versuche sind in der obigen Tabelle zusammengestellt.

Die angewandten Dosen für die meisten Hormone liegen in einem identischen Dosenbereich; beim Cortexon wurden auch relativ höhere Dosen geprüft. Diese Dosenauswahl beruht für Cortexon auf der lokal geringeren Wirksamkeit der Substanz, für Aldosteron auf der kleinen verfügbaren Substanzmenge. Die Versuche zeigen erneut die bereits früher beschriebene ausgesprochene Granulomhemmung von Cortison und Hydrocortison[2]. Cortison hat bereits bei 100 γ beginnend eine deutlich hemmende Wirkung, Hydrocortison ist noch wirksamer, und schon 100 γ zeigen etwa die gleiche Wirkung wie 1 mg Cortexon. Wie früher beschrieben[1], wirkt Cortexon lokal granulomhemmend. Es besitzt in Dosen von 100 γ eine geringe und von 1 mg an eine ausgesprochene Granulomhemmung, ist aber weniger wirksam als Cortison und Hydrocortison. Corticosteron zeigt in dieser Versuchsanordnung eine etwas stärkere Wirkung als Cortexon, besonders bei der Dosis von 1 mg.

Im Gegensatz zu allen diesen Hormonen zeigt Aldosteron in den geprüften Dosen eine deutliche Granulomförderung. Verglichen mit Hydrocortison ist in einer Dosis von 100 γ, bei der Hydrocortison stark hemmt, eine deutliche Förderung bei Aldosteron vorhanden. Ähnlich liegt die Wirksamkeitsrelation bei Cortison und Corticosteron. Beim Vergleich mit Cortexon hat man die ca. 25 mal grössere Wirksamkeit des Aldosterons in anderen Testen zu berücksichtigen[2]. Bei einer Dosis von 1 mg bewirkt Cortexon eine ausgesprochene Hemmung der Granulombildung, während Aldosteron bei einer 20fach kleineren Dosis eine Förderung derselben hervorruft, die bei dem Doppelten und Vierfachen dieser Dosis ebenfalls deutlich ist. Es ist nicht vollständig ausgeschlossen, dass Aldosteron bei noch höheren Dosen eine Hemmung des Granulomwachstums hervorrufen könnte.

Es geht aus diesen Befunden hervor, dass Aldosteron in diesem Test sich besonders in qualitativer Weise von anderen untersuchten Nebennierenrindensteroiden unterscheidet. Zur Ergänzung dieser Versuche wurden einzelne Befunde mit allgemeiner Applikation von Aldosteron erhoben, die zeigen, dass Aldosteron bei allgemeiner Applikation in der Dosis bis zu 1 mg/kg keine Wirkung auf das Granulomwachstum besitzt. Die Prüfung höherer Dosen ist beabsichtigt. Es scheint angezeigt, die beobachtete Wirkung des Aldosterons hinsichtlich des

[1] R. Meier, W. Schuler und P. Desaulles, Exper. *6*, 469 (1950).

[2] R. Meier, F. Gross, P. Desaulles und B. Schär, Bull. Schw. Akad. Med. Wiss. *8*, 34 (1952). – P. Desaulles und R. Meier (im Druck).

[1] R. Meier, F. Gross, P. Desaulles und B. Schär, Bull. Schw. Akad. Med. Wiss. *8*, 34 (1952).

[2] P. Desaulles, J. Tripod und W. Schuler, Schw. med. Wschr. *83*, 1088 (1953). – F. Gross und H. Gysel, Acta Endocrinol. *15*, 199 (1954).

Bindegewebswachstums bei der Auffindung klinischer Wirkungen zu berücksichtigen.

P. Desaulles, W. Schuler und R. Meier

Wissenschaftliche Laboratorien der Ciba-Aktiengesellschaft Basel, den 30. Oktober 1954.

Summary

Aldosterone applied locally in doses of 50–100 γ enhances slightly the growth of granuloma and in doses of up to 200 γ fails to inhibit such growth. In the doses, then, its action differs from that of hydrocortisone, cortisone, and cortexone.

—

The Toxic Action of Halogenated Alkylating Substances on Insects. Inhibition of Triosephosphate Dehydrogenase

In a previous paper[1] we have described the insecticidal action by contact of some alkylating substances (chloro-, bromo-, iodoacetic acids and their esters) on insects. With iodoacetic acid, nearly all iodine penetrated by contact into the insect was recovered as inorganic iodide. This seems to indicate a reaction of the following type:

$$RSH + ICH_2COOH = RSCH_2COOH + HI$$

since, as demonstrated by Michaelis and Schubert[2], under physiological conditions, iodoacetic acid reacts with thiol groups, whereas it does not react with amino or hydroxyl groups.

As the toxic action of iodoacetic acid on vertebrates is due to the inhibition of thiol enzymes[3], we have studied the effect of iodoacetic acid on the succinic dehydrogenase of insects *in vivo* and *in vitro*. As already published[4], we found no evident inhibition of succinic dehydrogenase on the muscle tissue of *Periplaneta americana*, neither *in vitro* at a concentration of about 0·007 *M*, nor *in vivo* at doses highly above lethal.

In the course of recent studies, however, we have observed that triosephosphate dehydrogenase (TPD) is considerably inhibited by halogenated alkylating substances in *P. americana* and *Musca domestica*, *in vitro* as well as *in vivo*. We have developed a colorimetric method for dosage of TPD employing 2,6-dichlorophenolindophenol as hydrogen acceptor. In our *in vitro* experiments, iodoacetic acid at concentrations of 0·0005 *M* inhibits 80% of TPD.

For the experiments *in vivo* we have employed the following technique. One metathoracic leg has been cut off from females of *P. americana* (groups of 100 individuals each) at the level of the trochantin eliminating the femur and the other distal segments. The same individuals have then been injected with an aqueous solution of sodium iodoacetate, and after 60′ the metathoracic leg of the opposite side was cut off in order to evaluate the eventual inhibition of TPD by the injected substance. At doses of 1 mg/g (the LD_{50} for females *P. americana* being equal to 0·1 mg/g), a complete inhibition of the enzyme was reached.

TPD has also been determined on *M. domestica* extracts. Groups of 100 females belonging to the following strains have been used: Roman susceptible strain; Sardinian strain resistant to DDT and Chlordane. Both strains were found to be equally susceptible to chloroacetic acid.

The TPD activity of fly extracts of unpoisoned individuals proved to be equal for the two strains. In our toxicity tests, groups of houseflies have been placed in contact with filter paper treated with an olive oil solution of chloroacetic acid at concentrations varying from 0·25 to 6·0 g/sq.m.

The "kill"[1] percentage and the enzyme inhibition percentage have been determined for all groups. It was shown that inhibition and "kill', relative to the chloroacetic acid concentrations, have a parallel trend; the values of inhibition are lower than those of "kill" (Table). This could be explained either by supposing that, under the conditions described, a 100% inhibition is not essential to determine the death of individuals, or by assuming that these substances inhibit selectively the activity of certain vital organs.

Musca domestica ♀♀ (strain resistant to DDT and Chlordane, age 5 days) exposed to different concentrations of chloroacetic acid. "Kill" percentages and TPD inhibition percentages in fly extracts.

Chloroacetic acid g/m²	"kill" %	TPD inhibition %
0·5	5	0
1·00	25	6
1·50	65	50
2·00	75	65
3·00	90	75

This second hypothesis is supported by our observations on the cardiac activity of *P. americana*. We have noted that the cardiac activity of roaches which have been injected with different doses of sodium iodoacetate ceased at least one hour before the insects showed any blocking of their voluntary muscles' activity. This blocking of the cardiac activity appears to be an irreversible phenomenon and death occurs after a few hours, according to the dose of the injected substance.

In order to determine whether resistance toward the halogenated alkylating substances could be induced in strains of *M. domestica*, groups of houseflies were taken from the two above-mentioned strains and the adults were exposed for 20 generations to chloroacetic acid by contact. Comparing these two selected strains with the original ones, a small increase in the LD_{50} for chloroacetic acid (about twice), but no increase of TPD in the *in toto* extracts was observed.

Fuller details of this work will be published in the Rendiconti dell'Istituto Superiore di Sanità, Rome.

S. Bettini and M. Boccacci

Departments of Parasitology and Biology, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy, September 18, 1954.

Zusammenfassung

Nachdem die Verfasser auf ihre früheren Aufsätze über die auf Insekten wirkenden alkylisierten halogenierten Stoffe hingewiesen haben, fassen sie die Er-

[1] S. Bettini and M. Boccacci, Riv. Parass. *13*, 165 (1952).

[2] L. Michaelis and M. P. Schubert. J. Biol. Chem. *106*, 331 (1934).

[3] E. S. Guzman Barron, Advances in Enzymology *11*, 201 (1951).

[4] S. Bettini and M. Boccacci, Rend. Ist. Sup. San. *17*, 188 (1954).

[1] We have considered "killed" all individuals knocked down, muribund or dead. Since the toxic action is an irreversible one, all knocked down individuals are destined to die.

gebnisse zusammen, die sie bei der Wirkung der genannten Stoffe auf die in den Muskelgeweben von *P. americana* und *M. domestica* befindlichen Triosephosphatdehydrogenasen (TPD) erzielt haben.

Die Dosierung der TPD ist kolorimetrisch bestimmt worden, indem 2,6-Dichlorphenol-Indophenol als Wasserstoffakzeptor gebraucht wurde.

Es hat sich gezeigt, dass TPD sowohl *in vitro* wie *in vivo* inhibiert wird. In Hausfliegen hat die Mortalität der Fliegen und die TPD-Inhibition bezüglich der verschiedenen Stärken der Dichloressigsäure einen parallelen Verlauf, und die Inhibitionswerte sind niedriger als die der Mortalität.

Hausfliegenstämme, die während 20 Generationen hindurch im Chloressigsäurekontakt selektioniert wurden, weisen weder eine auffällige Resistenzzunahme gegen diesen Stoff noch eine Steigerung von TPD in den Extrakten dieser Fliegen auf.

Der Hyaluronsäuregehalt und die «Hyaluronidase»-Aktivität der Leukozyten

In früheren Mitteilungen haben wir bei mehreren Gelegenheiten darauf hingewiesen, dass die Hyaluronidase («Wyeth», Philadelphia) die Bakterienphagozytose der überlebenden Leukozyten von Kaninchen und Ratten *in vitro* steigert. Der Effekt erreicht bei einer Konzentration von 1 TRU sogar 60–65% und tritt auch bei Anwendung von zehnmal höherer Verdünnung in Erscheinung. Inaktivierte (56C°) Hyaluronidaselösung ist unwirksam[1].

Um die Erscheinung weiter zu klären, haben wir den Hyaluronsäuregehalt der Leukozyten untersucht.

Drei bis vier hungernden Ratten von je 200 bis 250 g Körpergewicht haben wir je Tier etwa 15 ml sterile Bouillon in die Bauchhöhle injiziert. Nach 6 h wurden die Tiere durch Dekapitation verblutet. Die eröffnete Bauchhöhle wurde mit 20 mg% Zitrat enthaltender physiologischer Kochsalzlösung ausgespült und die ausgewanderten Leukozyten durch Zentrifugierung der Spülflüssigkeit sedimentiert. Das Verfahren wurde mehrmals wiederholt und die Leukozyten so durchgewaschen. Auf diese Weise konnten wir 500 bis 700 mg Leukozyten (Nassgewicht) gewinnen.

Die Bestimmung des Hyaluronsäuregehaltes geschah in autolysierten Leukozyten. Zwecks Verdauung liessen wir die Zellensuspension mit trikresolgesättigtem destiliertem Wasser vermischt 3 Tage bei Zimmertemperatur stehen. Die Konzentration der Hyaluronsäure haben wir mittels Turbidimetrie[2] festgestellt und nach der Hyaluronidasewirkung («Wyeth») die Menge der frei gewordenen reduzierenden Stoffe bestimmt[3]. Für eine Bestimmung verwendeten wir 200–400 mg Leukozyten.

Unsere Versuchsergebnisse sind in der Tabelle I dargestellt. Sie zeigen, dass in den Leukozyten sowohl turbidimetrisch als auch oxydimetrisch eine ansehnliche Menge Hyaluronsäure nachweisbar ist. Die auf das Nassgewicht berechnete Konzentration beträgt im Mittelwert turbidimetrisch 0,8%, oxydimetrisch – damit gut übereinstimmend – 0,7%.

Bei der Untersuchung der «Hyaluronidase»-Aktivität der Leukozyten konnten wir mittels der viskositätreduzierenden Methode[1] eine ausdrückliche hyaluronsäurezersetzende Wirkung beobachten. Das Versuchssystem bei den viskosimetrischen Bestimmungen war folgenderweise zusammengestellt: Hyaluronsäure, 1%ige wässerige Lösung, 9 ml; Leukozytensuspension (enthaltend 150 mg Leukozyten) 2 ml; Azetatpuffer M/10 2 ml, Ausflussdauer des Viskosimeters mit Wasser bei 18°C 42 s (Tab. II). Da der Effekt weder ein gut definierbares pH-Optimum noch ein Temperaturoptimum besitzt, kann die Erscheinung nicht als Enzymwirkung betrachtet werden. Demnach ist die «Hyaluronidase»-Aktivität der Leukozyten ihrem relativ hohen (20 bis 30 mg%) Ascorbinsäuregehalt[2] zuzuschreiben. Bekanntlich kann nämlich die Ascorbinsäure in Gegenwart von Spuren von Cu^{++} zwischen oxybiotischen Verhältnissen die Hyaluronsäure oxydativ abbauen[3]; dieser Prozess ist auch in dem Falle der Leukozyten nachweisbar. Der Effekt lässt sich durch Oxin (8-Oxikinolin) und Semicarbazid hemmen.

Tabelle I

Zahl der Versuche	Hyaluronsäuregehalt in % des Nassgewichtes	
	Turbidimetrisch	Oxydimetrisch
1	1,33	–
2	0,37	–
3	0,80	–
4	0,45	0,40
5	0,80	0,74
6	1,01	0,89

Tabelle II

Zahl der Versuche	Rel. Viskositätsabnahme in % während 1 h
1	15
2	18
3	14
4	9
5	13
6	17

Demnach steigert die Hyaluronidase die Phagozytose der Leukozyten auf dem Wege ihrer auf die Leukozyten ausgeübten Wirkung. Durch Enzymwirkung kann die Hyaluronsäure der Leukozyten abgebaut werden. Die Viskosität des Protoplasmas der Zellen nimmt dadurch ab, infolgedessen die amöboide Bewegung und die Durchgänglichkeit der Zellen und damit die Phagozytose erleichtert wird.

An dieser Stelle danken wir Herrn Prof. R. Meier (Ciba, Basel) und Herrn Dir. Dr. J. Seifter (Wyeth, Philadelphia) für die uns freundlichst zur Verfügung gestellte Hyaluronsäure bzw. Hyaluronidase.

G. Ludány und L. Perényi

Pathophysiologisches Institut der Medizinischen Fakultät der Universität Budapest, den 9. August 1954.

[1] G. Ludány, T. Orbán und J. Vajda, Tag. Ung. Physiol. Ges. 7. Sept. 1951; Acta Physiol. Hung. Arch. int. Pharmacodyn. *87*, 496 (1952).

[2] K. Meyer, Physiol. Rev. *27*, 335 (1947); – K. Meyer und M. M. Rapport, Arch. Biochem. *27*, 287 (1950).

[3] J. T. Park und M. I. Johnson, J. Biol. Chem. *181*, 149 (1949).

[1] J. Madinaveitia und T. H. H. Quibell, Biochem. J. *34*, 625 (1940).

[2] G. Ludány und K. Mégay, C. r. Soc. Biol. Paris *126*, 321 (1937).

[3] M. G. Romanini, Arch. int. Pharmcodyn. *78*, 427 (1949). – W. van Robertson, M. W. Rupes und W. Bauer, Biochem. J. *35*, 903 (1941). – W. Daubenmerkl, Acta pharmacol. et toxicol. *7*, 153 (1951).

Summary

The hyaluronic acid content of leucocytes from the peritoneum of rats shows a significant concentration when measured either turbidimetrically or oxydimetrically, the average value calculated for wet weight being 0·7–0·8 %. The hyaluronic acid break down capacity of the leucocytes is not a specific enzyme action but can be attributed to their high ascorbic acid content. The phenomenon has no well defined pH or temperature optimum and can be inhibited by oxine and by semicarbazide.

Die Wirkung von Kalium und Calcium auf das Treppenphänomen am Froschherzen[1]

In früheren Untersuchungen[2] war gezeigt worden, dass die zeitliche Entwicklung der Herzglykosidwirkung am elektrisch gereizten Froschventrikelpräparat von der Zahl der während der Einwirkungszeit des Glykosids erfolgten Herzkontraktionen abhängt, was auf eine Beeinflussung der Ionentransporte im Erregungs- und Erholungszyklus zurückgeführt wurde. Diese Deutung wurde weiter gestützt durch den Nachweis, dass die Herzglykosidwirkung in ausgesprochener Weise vom Konzentrationsverhältnis der Ionen in der verwendeten Ringerlösung abhängt[3]. Erhöhung der Calciumkonzentration oder Verminderung der Kaliumkonzentration wirken verstärkend und umgekehrt. Im Hinblick auf die bekannte, von Loewi[4] beschriebene Sensibilisierung des Herzmuskels gegenüber Calciumionen und auf den Befund von Schatzmann[5], dass Herzglykosid den aktiven Kalium-Natrium-Austausch am Erythrozyten hemmt, wurde angenommen, dass die Herzglykosidwirkung in einer Hemmung von Ionentransporten durch die Muskelzellmembran besteht, auf Grund derer sich die Calciumionenkonzentration im Inneren der Zelle erhöht.

Szent Györgyi[6], der ebenfalls die Ionentransporte durch die Membran als den Angriffspunkt des Herzglykosids betrachtet, hat als Kriterium das Phänomen der Bowditchschen Treppe eingeführt. Er zeigte, dass die Treppe sowohl durch Digitalis als auch durch kaliumfreie Ringerlösungen unterdrückt werden kann. Er nahm danach an, dass sie auf Anhäufung von Kalium im Inneren der Muskelfaser während der Ruheperiode beruht und dass Digitalis den Kaliumeintritt hemmt.

Die von uns bevorzugte Annahme, das für die muskuläre Glykosidwirkung Wesentliche sei die Innenkonzentration der Calciumionen, stützte sich einmal auf die genannte Beziehung zur Calciumsensibilisierung durch Herzglykoside, dann aber auch auf die Tatsache, dass am Aktomyosinsystem Kalium und Natrium sich ähnlich verhalten[6], so dass eine Beeinflussung des Aktomyosins von dieser Seite aus weniger wahrscheinlich erschien, da sowohl beim Erregungsvorgang als beim Erholungsvorgang die Gesamtbilanz in erster Annäherung ein Austausch von Kalium gegen Natrium zu sein scheint.

Dagegen übt Calcium eine sehr ausgesprochene Wirkung auf Aktomyosin schon in niedrigen Konzentrationen aus[1], die als kontraktions- und kontrakturbegünstigend bezeichnet werden kann.

Die Annahme einer Beteiligung der Calciumionen wurde weiter gestützt durch den Nachweis, dass der Austritt von ^{45}Ca aus dem Ventrikelpräparat durch Herzglykosid gehemmt werden kann[2].

In bezug auf die Bowditchsche Treppe wäre dann mit einiger Wahrscheinlichkeit zu erwarten, dass sie durch Erhöhung der Calciumionenkonzentration ähnlich unterdrückt oder vermindert werden sollte wie durch Kaliummangel. Die hier mitgeteilten Versuche dienen der Prüfung dieser Folgerung.

Methodik. Die Versuche wurden am elektrisch gereizten, isotonisch arbeitenden Froschventrikelpräparat durchgeführt, das in einem offenen Kreislauf arbeitet (Doppelkanüle und Ventile). Das Schlagvolumen wurde mit später ausführlicher zu beschreibenden pneumatischen Übertragungsmethoden am freischlagenden Herzen (ohne Serrefine) registriert. Die Reizung erfolgte mit rechteckigen Stromstössen (Grass-Stimulator, 45 V, 5 ms) alle 3 s. Zur Entwicklung der «Treppe» wurden reizfreie Pausen von 10 min eingeschaltet.

Resultate. Abbildung 1 zeigt einen Versuch, in dem die Treppe durch Verdoppelung der Calciumionenkonzentration der Ringerlösung fast aufgehoben wird, in Übereinstimmung mit der Erwartung.

Zum quantitativen Vergleich zwischen der Wirkung von Kaliummangel und Calciumüberschuss wurden alternierende Reizperioden (mit 10 min Reizpause) in normaler Ringerlösung, Ringerlösung mit vermindertem Kaliumgehalt und Ringerlösung mit erhöhtem Calciumgehalt durchgeführt, wobei die beiden Ionenkonzentrationen in gleichen Verhältnissen (mit p bezeichnet) abgestuft wurden (zum Beispiel $p = 1{,}4$: Kalium 1/1,4-fach, Calcium 1,4fach).

Als Mass der «Treppe» wurden aus V_1, dem Schlagvolumen der ersten Kontraktion nach der Reizpause (bzw. V_{1-7}, dem mittleren Schlagvolumen der ersten sieben Kontraktionen), und V_m, dem maximalen Schlagvolumen der gleichen Reizperiode, Treppenquotienten T gebildet:

$$T_1 = \frac{V_m - V_1}{V_m} \qquad \text{und} \qquad T_{1-7} = \frac{V_m - V_{1-7}}{V_m}.$$

In Abbildung 2 ist ein solcher Versuch wiedergegeben. Er zeigt, dass bei gleichem p Calciumüberschuss stärker wirkt als Kaliummangel. – Er zeigt ausserdem, dass der Treppenquotient in Ringerlösung T_R zeitlich nicht konstant ist, so dass es zweckmässig scheint, die Quotienten T auf den jeweiligen (durch Interpolation zu ermittelnden) Quotienten zu beziehen und relative Quotienten $T' = T/T_R$ zu benützen.

Abbildung 3 zeigt im Mittel aus zwei ähnlichen Versuchsreihen T' als Funktion von p für Calciumüberschuss und Kaliummangel, getrennt für T'_1 und T'_{1-7}.

Vergleicht man Kalium- und Calciumkonzentrationen gleicher Wirksamkeit (das heisst mit gleichen Werten von T') durch die Relation $\log p_K = n \cdot \log p_{Ca}$ oder $p_K = p_{Ca}^n$, so ergibt sich aus diesen Versuchen für T'_1 ein Wert von $n = 4{,}8$, für T'_{1-7} ein solcher von $n = 3{,}25$.

Das Verhältnis der Wirkung von Calciumüberschuss und Kaliummangel hängt danach davon ab, ob T'_1 oder T'_{1-7} als Mass benützt wird. Da T'_1 nur oder vorwiegend

[1] Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Roche-Stiftung durchgeführt.

[2] B. Lévi, *Die Abhängigkeit der Strophanthosidwirkung auf das Froschherz von der Tätigkeit des Herzens.* Dissertation, Bern 1953. – W. Wilbrandt, K. Brawand und P. N. Witt, Arch. exp. Path. Pharm. *219*, 397 (1953).

[3] W. Wilbrandt und R. Caviezel, Arch. exp. Path. Pharm. *222*, 203 (1954).

[4] O. Loewi, Arch. exp. Path. Pharm. *82*, 131 (1918).

[5] H.-J. Schatzmann, Helv. physiol. Acta *11*, 346 (1953).

[6] A. Szent-Györgyi, *Chemical physiology of Contraction in Body and Heart Muscle* (Academic Press, New York 1953).

[1] E. Bozler, Amer. J. Physiol. *167*, 276 (1951).

[2] W. Wilbrandt und R. Caviezel, Helv. physiol. Acta 1954 (im Druck).

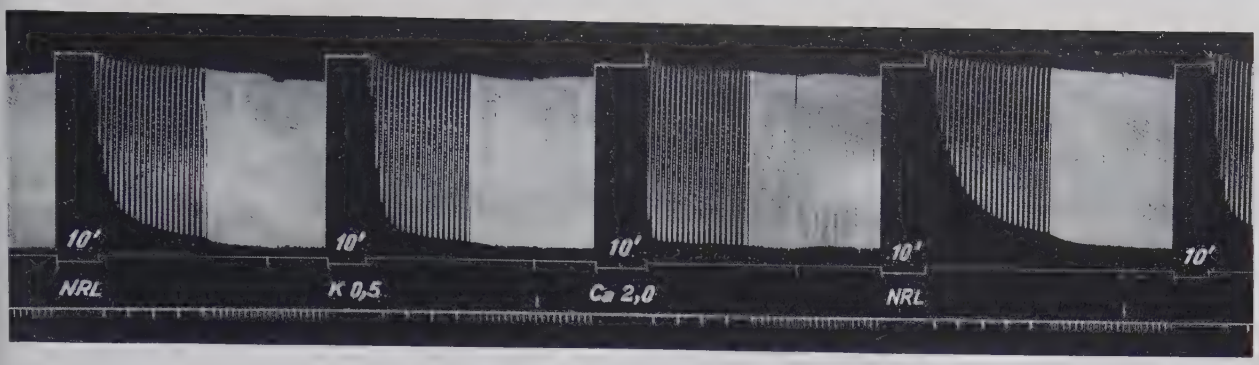


Abb. 1. Registrierkurven des Schlagvolumens am Froschventrikelpräparat bei elektrischer Reizung (alle drei Sekunden). Vergleich des Treppenphänomens (nach Reizpausen von 10 min) in Ringerlösungen normaler Zusammensetzung, mit halbem Kaliumgehalt und mit doppeltem Calciumgehalt. Die Treppe wird durch Erhöhung des Calciumgehalts stärker gehemmt als durch Verminderung des Kaliumgehalts.

durch die Vorgänge in der Erholungsphase, T'_{1-7} ausserdem auch durch die Erregungsphasen der ersten Kontraktionen nach der Reizpause beeinflusst ist, deutet das Resultat offenbar darauf hin, dass Kalium (relativ zu Calcium) in der Erholung weniger stark auf die für die Treppe bestimmenden Vorgänge wirken muss als in der Erregung.

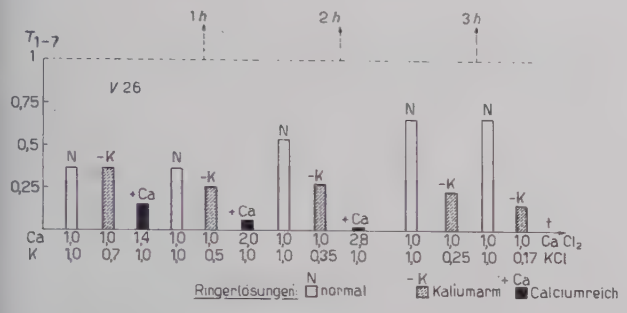


Abb. 2. Quantitative Bestimmung der Treppe mit Hilfe des Treppenquotienten T_{1-7} (Ordinate) am elektrisch gereizten Froschventrikelpräparat unter Variation der Zusammensetzung der Ringerlösung in bezug auf Kalium- und Calciumkonzentration. Abszisse: Zeit in Stunden. Unter jeder Messung ist die Zusammensetzung der verwendeten Ringerlösung angegeben (1,0 = normaler Calcium- bzw. normaler Kaliumgehalt).

Trifft unsere Annahme zu, dass Calciumionen in Erregung und Erholung gleichsinnig mit Natrium durch die Membran transportiert werden und dass die Treppe durch die Calciuminnenkonzentration am Ende der Reizpause bestimmt wird, so würde in der Erholung in erster Linie der Auswärtsflux des Calciums, in der Erregungsphase der Einwärtsflux als Angriffspunkt solcher Wirkungen zu betrachten sein. Verhältniszahlen wie die gefundenen, dürften mit einiger Wahrscheinlichkeit mit abgestuften Affinitäten zu Trägermolekülen in Beziehung stehen. Für detailliertere Deutungen scheint aber gegenwärtig die experimentelle Basis noch zu schmal.

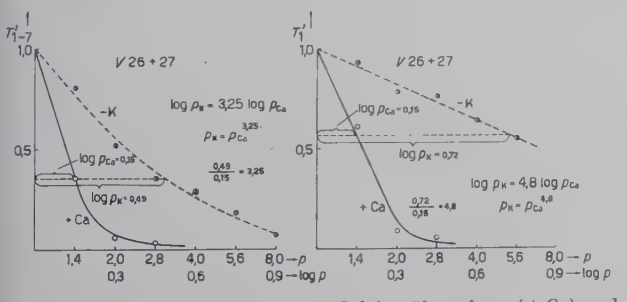


Abb. 3. Vergleich der Wirkung von Calciumüberschuss (+ Ca) und Kaliummangel (— K) auf das Treppenphänomen, das quantitativ mit Hilfe der relativen Treppenquotienten T' (nähere Definition siehe im Text) charakterisiert wird. Abszisse: Verhältniszahl p für die Veränderung der Calciumkonzentration (Erhöhung) bzw. der Kaliumkonzentration (Verminderung). Näheres im Text.

M. Moulin und W. Wilbrandt

Pharmakologisches Institut der Universität Bern, den 19. August 1954.

Summary

The stair-case phenomenon of Bowditch was studied on the electrically stimulated frog ventricle preparation. It depends not only on the concentration of potassium, as shown by Szent-Györgyi, but also on that of calcium. Excess of calcium as well as lack of potassium depress it (Fig. 1). A change of the calcium concentration in the ratio p yields a considerably stronger effect than a change of the potassium concentration in the ratio $1/p$ (Fig. 2 and 3). It is assumed that the stair case depends mainly on the concentration of calcium ions in the interior of the muscle fibers and that this concentration is affected not only by the outside concentration of calcium ions but (due to common affinities to carrier molecules) also by that of the potassium ions.

Some Metabolic Changes Occurring in Skeletal and Heart Muscles of Guinea Pigs Treated with Tetanus Toxin

The information available about the metabolic changes which occur in tetanized muscles is scarce. This paper reports the results of an investigation on the oxidative and phosphorylative activities of skeletal and heart muscles of guinea pigs after injection with tetanus toxin.

When the toxin of *Clostridium tetani* is injected intramuscularly in the guinea pig, tetanus is produced first in the muscles into which the toxin was injected (local tetanus). In a further stage, the animals develop tetanus also in the other, non-injected muscles (generalized tetanus). In this research, both stages were considered for the study of possible metabolic changes.

Guinea pigs weighing 230–300 g and fed with a standard diet were used. Tetanus toxin (a purified preparation from a culture filtrate of *Cl. tetani*, obtained by treatment with saturated ammonium sulphate) was injected

Table I.–Analysis of phosphorus fractions. (The data are referred to 1 g of fresh tissue and are given as mg ± σ.)

Phosphorus Fractions	Normal animals (4 experiments)		Animals with local tetanus (5 experiments)			Animals with generalized tetanus (3 experiments)		
	Leg muscle	Heart	Injected leg muscle	Controlateral leg muscle	Heart	Injected leg muscle	Controlateral leg muscle	Heart
Total P	1·788 ± 0·212	0·942 ± 0·008	1·404 ± 0·115	1·597 ± 0·208	0·891 ± 0·08	1·201 ± 0·200	1·148 ± 0·200	0·980 ± 0·04
"True" inorganic P	0·907 ± 0·252	0·431 ± 0·001	0·705 ± 0·096	0·901 ± 0·154	0·434 ± 0·135	0·605 ± 0·142	0·540 ± 0·02	0·540 ± 0·02
Phosphocreatine P	0·085 ± 0·04	0·038 ± 0·013	0·065 ± 0·009	0·063 ± 0·029	0·049 ± 0·014	0·104 ± 0·005	0·108 ± 0·005	0·014 ± 0·001
7′ P*	0·373 ± 0·061	0·124 ± 0·028	0·199 ± 0·079	0·243 ± 0·06	0·096 ± 0·023	0·149 ± 0·001	0·156 ± 0·04	0·260 ± 0·02
Ribose in this fraction	0·986 ± 0·162	0·390 ± 0·09	0·565 ± 0·184	0·680 ± 0·120	0·278 ± 0·038	0·450 ± 0·07	0·500 ± 0·06	0·085 ± 0·007
Molar ratio 7′P/ribose	1·83	1·54	1·70	1·73	1·61	1·60	1·52	1·71
ATP	1·687	0·365	0·759	0·967	0·319	0·459	0·442	0·329
ADP	0·436	0·393	0·411	0·629	0·259	0·410	0·515	0·169
HDP P	0·028 ± 0·014	0·088 ± 0·001	0·089 ± 0·048	0·075 ± 0·022	0·072 ± 0·006	0·048 ± 0·001	0·036 ± 0·012	0·063 ± 0·005
PPA P	0·135 ± 0·061	0·033 ± 0·017	0·094 ± 0·045	0·075 ± 0·014	0·056 ± 0·024	0·032 ± 0·04	0·045 ± 0·01	0·124 ± 0·004
Ba-soluble alcohol insoluble P	0·133 ± 0·07	0·136 ± 0·012	0·207 ± 0·023	0·216 ± 0·02	0·127 ± 0·01	0·250 ± 0·04	0·200 ± 0·02	0·105 ± 0·005
AMP	1·488	1·530	2·317	2·417	1·421	2·798	2·238	1·175
Ba-soluble alcohol soluble P	0·051 ± 0·007	0·096 ± 0·001	0·049 ± 0·016	0·040 ± 0·0	0·040 ± 0·019	0·050 ± 0·02	0·056 ± 0·01	0·052 ± 0·004
Adenine**	1·164	0·816	1·249	1·395	0·719	1·340	1·150	0·594
Total Recovery	1·712	0·946	1·408	1·613	0·874	1·238	1·141	0·983
Recovery %	95·6	100·4	100·2	101·0	98·1	103·0	99·3	100·3

* values corrected for 22·6% content of HDP P

** spectrophotometrically, 260 mμ

into the muscles of one leg. The injected amount was 10 L.D. pro animal. The animals were killed by bleeding and the leg muscles of both the injected and non-injected side, and the heart, were immediately removed and frozen with fluid carbonium dioxide. The amount to be used for analysis was then rapidly weighed and homogenized. The analysis of phosphorus (P) fractions was made on homogenates prepared by grinding the tissue (2 g of skeletal muscle or 1 heart deprived of the large vessels and of the fat) in a mortar and by suspending it in 7% trichloroacetic acid. The suspension was then homogenized in a Waring blendor by running for 30″ at 3000 R.P.M. The homogenate was then made up to 40 ml with 7% trichloroacetic acid, filtered and analysed. In one group of experiments, the animals were killed under magnesium sulphate anaesthesia, induced by intraperitoneal inoculation (Pinchot and Bloom[1]). Treatment with $MgSO_4$ was used by these authors in order to inhibit the splitting of ATP through ATPase, during the preparation of the extracts.

The analysis of phosphorus fractions was made according to the procedure described by Le Page[2]. 3 fractions were collected: Ba-insoluble (precipitation with Ba acetate, pH 8·2, followed by removal of Ba with H_2SO_4), Ba soluble-alcohol insoluble (precipitation with 4 volumes of absolute ethanol), Ba soluble-alcohol soluble. Following determinations were made on each of 3 fractions and on the original unfractionated extract: total P, inorganic orthophosphate P (IP) adenine. "True" inorganic P (precipitation with $CaCl_2$, saturated with $Ca(OH)_2$, pH 8·8) was determined only in the unfractionated extract. Phosphocreatine P was then calculated by difference. The following determinations were made on Ba-insoluble fraction, in addition to those reported above: 7′ P, ribose, fructose. 7′ P was determined after hydrolysis at 100°C for 8′ with 1 N HCl. The values obtained were corrected for 26·5% of total hexosediphosphate P, t.i. the amount of this substance which is hydrolysed in 8′ by 1 N HCl at 100°C. Ribose was determined by the orcinol method of Meijbaum[3], the extinctions being read at 660 mμ. From the molar ratios of 7′ P to ribose, the actual amounts of ATP and ADP respectively present in this fraction were calculated, by assuming that ATP contains 2 easily hydrolysable P units per mole of ribose and ADP only 1.

Hexosediphosphate P was calculated from the values obtained for fructose. This was determined by the resorcinol test of Roe[4], the extinctions being read at 490 mμ. Since hexosediphosphate does not react as the theoretical amount of fructose (Le Page), the actual values were obtained by multiplying the fructose values by the factor 3·6.

When the sum of the values obtained for inorganic orthophosphate P, 7′ P and hexosediphosphate (HDP) is subtracted from that of total P present in the Ba-insoluble fraction, a residual amount of P is obtained. This is stated by Le Page to consist mainly of phosphopyruvic acid (PPA). It has been reported in the table under this heading.

The amount of adenine present in each fraction was also checked by reading the extinction at 260 mμ.

Phosphorus determinations were made by the method of Fiske and Subbarow[5]. The colour (Mo_3O_8) was de-

[1] L. B. Pinchot and W. L. Bloom, J. Biol. Chem. *184*, 9 (1950).

[2] A. Le Page, in *Manometric Techniques and Tissue Metabolism*. edit. by W. W. Umbreit, R. H. Burris, and J. F. Stauffer (Burgess Publ., Minneapolis, 1951).

[3] W. Meijbaum, Z. Physiol. Chem. *258*, 117 (1939).

[4] J. H. Roe, J. Biol. Chem. *107*, 15 (1934).

[5] C. H. Fiske and Y. Subbarow, J. Biol. Chem. *66*, 375 (1925).

Table II.–Succinoxidase, d-amino acid oxidase and cytochrome oxidase activities in normal and tetanized skeletal muscles of guinea pigs. (The values are referred to 1 g of fresh tissue and 1 h; in the case of sarcosomes, they are referred to the material isolated from 1 g of tissue. The data are given as $\mu 10_2 \pm \sigma$. Temperature 38° C.)

Animals	Number of experiments	Homogenates						Sarcosomes					
		Succinoxidase		d-aminoacidoxidase		Cytochrome oxidase		Succinoxidase		d-amino acidoxidase		Cytochrome oxidase	
		$\mu 10_2$	$\mu 10_2$/N	$\mu 10_2$	$\mu 10_2$/N	$\mu 10_2$	$\mu 10_2$/N	$\mu 10_2$	$\mu 10_2$/N	$\mu 10_2$	$\mu 10_2$/N	$\mu 10_2$	$\mu 10_2$/N
Normal	5	3595±318	214	620±29	36·9	4354±427	259	1647±156	1372	371±13	308	2420± 67	2016
Tetanized	6	3820±156	226	664±43	39·3	4423±374	261	1783±145	1114	370± 6	218	2517±243	1573

Nitrogen content of homogenates was mg 16·8 ± 1·2 for normal muscles, 16·9 ± 0·8 for tetanized muscles. That of mitochondria was 1·2 ± 0·1 for normal muscles, 1·6 ± 0·2 for tetanized muscles.

veloped with 40 % $SnCl_2$ in concentrated HCl. Readings were made at 730 mμ. Nitrogen was determined by usual microkjeldhal technique.

Table III.–Oxidative phosphorylation in skeletal muscles of normal and treated guinea pigs. (The data represent μatoms O_2 taken up in 10′ at 25°C and μatoms P disappeared from the incubation mixture during the same time. 30 μM substrate, 200 mg tissue, reaction mixture as indicated in the text).

Animals Substrate	μAO	μAP	P:O
Normal glutamate	2·5	5·6	2·24
Normal glutamate	2·3	6·0	2·6
Normal α-ketoglutarate	2·0	7·6	3·7
Normal α-ketoglutarate	2·1	7·8	2·5
Local tetanus-glutamate.	2·4	6·2	2·4
Local tetanus-glutamate.	2·2	6·2	2·8
Local tetanus-α-ketoglutarate . .	2·1	7·9	3·7
Generalized tetanus-glutamate . .	2·0	4·0	2·0
Generalized tetanus-glutamate . .	2·2	4·2	1·9
Generalized tetanus-α-ketoglutarate	2·0	5·8	2·9

The homogenates for enzyme determinations were prepared in a Potter-Elvehjem glass apparatus with the technique described by SCHNEIDER[1]. The tissues were finely minced with scissors and ground in a mortar before submitting them to homogenization in the Potter-Elvehjem apparatus. Suspension fluid was 0·25 *M* sucrose. Succinoxidase was determined according to the method of POTTER and SCHNEIDER[2], d-amino acid oxidase with that of RODNEY and GARNER[3], with dl-alanine as a substrate. Cytochrome oxidase was determined according to the method of POTTER[4], ATPase activity according to that of POTTER and DUBOIS[5], with 0·01 N borate buffer, pH 7·0. Oxidative phosphorylation was studied at 25°C as previously reported (DIANZANI[6]), with 1 (+)-glutamate or with α-ketoglutarate as substrates, AMP as P acceptor, wheat germ hexokinase and fructose as a trapping system. P : O ratios were calculated by dividing the μatoms of inorganic orthophosphate P which disappeared from the incubation medium in 10′ by the μatoms of oxygen taken up by the system during the same time. Ratios very close to 3 were obtained for glutamate and to 4 for ketoglutarate in normal animals. The amount of tissue used corresponded to 200 mg of fresh tissue.

Table IV.–ATPase activity of homogenates, sarcosomes and myofibrils isolated from normal and from tetanized skeletal muscles of guinea pigs. (The values are given as mg inorganic orthophosphate P liberated in 1 h by 1 mg N of the enzymatic preparations. Standard deviations are also given.) Temperature 38° C, pH 7·0.

Animals	Number of experiments	Homogenates	Sarcosomes	Myofibrils
Normal . . .	6	37·5±5	128±37	49±15
Tetanized . .	5	39·5±5	147± 5	87±20

Nucleic acids determinations were made according to SCHMIDT and THANNHAUSER[1]. Myofibrils and muscle granules (sarcosomes) were isolated by using previously described methods (MOR[2]).

Each determination was made in duplicate. A BECKMAN spectrophotometer Mod. DU was used for the photometric determinations, a WARBURG conventional apparatus for the gasometric ones. The values obtained were studied statistically, standard deviation (σ), standard error of the standard deviation and the FISHER's "t" values being calculated for each average value[3].

Table I summarizes the results which were obtained in the experiments of fractionation of the P compounds. It is clear that the ATP content of tetanized skeletal muscles is strongly decreased. Animals with local tetanus showed a stronger decrease in the injected than in the controlateral leg. Such a difference disappeared in the animals showing generalized tetanus.

ADP concentration was slightly increased in tetanized muscles. This shows that the ADP synthesis through myokinase is probably unaffected. AMP, on the other hand, increased strongly. The total adenine content showed, therefore, only small modifications. An increase of HDP could be observed in the tetanized muscles. A certain degree of ATP decrease was found also in the heart of treated animals.

[1] W. C. SCHNEIDER, J. Biol. Chem. *165*, 585 (1946).
[2] W. C. SCHNEIDER and V. R. POTTER, J. Biol. Chem. *149*, 217 (1943).
[3] G. RODNEY and R. L. GARNER, J. Biol. Chem. *125*, 209 (1938).
[4] V. R. POTTER, *Manometric Techniques and Tissue Metabolism*, edited by W. W. UMBREIT, R. H. BURRIS and J. F. STAUFFER (Burgess Publ., Minneapolis, 1951).
[5] K. B. DUBOIS and V. R. POTTER, J. Biol. Chem. *150*, 185 (1943).
[6] M. U. DIANZANI, Biochimica et Biophysica Acta (in press).

[1] G. SCHMIDT and S. J. THANNHAUSER, J. Biol. Chem. *161*, 83 (1945).
[2] M. A. MOR, Exper. *9*, 342 (1953).
[3] R. A. FISHER, *Metodi statistici ad uso dei ricercatori* (U.T.E.T., Torino, 1948).

Table V.–Nucleic acids content of normal and tetanized skeletal muscles. The values are referred to 1 g of fresh tissue and are given as μg of NA, DNA or RNA phosphorus.

Animals	Number of experiments	Homogenates			Sarcosomes				
		Total NA	NA/N	DNA	DNA/N	RNA	RNA/N	RNA	RNA/N
Normal . . .	7	179 ± 14	10·6	44 ± 8	2·6	135 ± 7	8·0	20 ± 4	16·6
Tetanized . .	7	142 ± 12	8·4	31 ± 8	1·8	112 ± 11	6·6	24 ± 1	15·0

In the experiments which were made on animals killed under Mg sulphate anaesthesia, no difference was found between normal and tetanized muscles. The values found for ATP were about 20% higher, those for AMP about 20% lower, than those obtained in the non-anaesthesized guinea pigs. This is probably due to the fact that Mg sulphate produces inhibition of ATP splitting, while ATP synthesis is not greatly affected.

Table II shows that the oxidative capacities of tetanized muscles against succinate, dl-alanine and cytochrome c are practically not modified. Oxidative phosphorylation (Table III) is also quite normal in the earlier stage of tetanus, but decreases slightly with the progress of time. ATPase activity (Table IV) of both homogenates and sarcosomes does not show any significant modification. A striking difference was observed, however, in ATPase activity of myofibrils, which increased strongly in those isolated from tetanized muscles.

Nucleic acids (Table V) are decreased in tetanized muscles. The decrease affects both desoxyribo- and ribonucleic acids.

From this rapid survey of the results obtained, one may conclude that (1) ATP is strongly decreased in tetanized muscles; (2) ATP formation through the processes of oxidative phosphorylation is at least normal; (3) ATPase activity of myofibrils is strongly increased. (4) Nucleic acids are decreased. The most probable phenomenon responsible for the decrease of ATP thus resides in the activation of ATPase located within myofibrils.

ATP is known to exert in the muscle 2 fundamental functions: (1) it acts as a plasticizing (relaxing agent), which conditions the thread disposition of the polymeric actomyosine molecules; (2) it acts as the physiological contracting agent, its splitting being responsible for the shortening of the actomyosine threads. It has been shown (Bathe-Smith[1], Bendall[2], Weber and Portzehl[3]) that skeletal muscle in state of rigor mortis contains a very low amount of ATP and that rigor itself is probably due to the absence of the plasticizing action of ATP. Whether a mechanism, in some manner similar to that which occurs in rigor mortis, exists in the tetanized muscle is under investigation in this laboratory.

L. Michelazzi, Maria Assunta Mor, and M. U. Dianzani

Department of General Pathology of the University of Genoa, August 9, 1954.

[1] E. C. Bathe-Smith and J. R. Bendall, J. Physiol. *106*, 177 (1947); *110*, 47 (1949).

[2] J. R. Bendall, J. Physiol. *144*, 71 (1951).

[3] H. H. Weber and H. Portzehl, in *Progress in Biophysics*, edited by J. A. V. Butler and J. T. Randall, Vol. 4 (Pergamon Press Ltd., London, 1954).

Riassunto

Gli Autori hanno studiato il metabolismo ossidativo e le frazioni fosforilate dell'omogenato di muscolo e di cuore in cavie normali e in cavie trattate con tossina tetanica. Nel muscolo tetanizzato si produce una forte diminuzione di ATP, insieme con un forte aumento di AMP e con un lieve aumento di ADP. La fosforilazione ossidativa è normale, la succinossidasi, la d-amino-acidossidasi e la citocromossidasi non subiscono modificazioni, la ATPasi dell'omogenato totale e quella mitocondriale non presentano differenze significative dalla normale, ma la ATPasi presente nelle miofibrille è fortemente aumentata. Anche il contenuto di acidi ribo- e desossiribonucleinico è diminuito. Gli autori concludono che la diminuzione dell'ATP è dovuta ad una aumentata demolizione piuttosto che ad una diminuita sintesi.

Acetylcholine, Cholinergic Drugs, and Cortical Electrical Activity

It appears certain that acetylcholine (Ac) has some part to play at the level of the central nervous system, but this role has by no means been entirely clarified or put in its true context (Feldberg[1]).

The conclusions which may be drawn after analysis of the results obtained in the series of investigations, which have appeared on this subject since 1937, cannot be definite. A certain number of facts are, however, available for discussion.

It is possible to influence cortical electrical activity either by cholinergic or anti-cholinergic drugs; and the modifications obtained are very similar to functional physiological states which can be induced in the normal animal. In fact, the modifications induced by anti-cholinesterasic drugs, such as eserine and DFP, closely resemble the state of activation of the cortex (Wescoe and co-workers[2], Funderburk and Case[3], Bradley and Elkes[4]), whereas those induced by atropine and other anticholinergic drugs resemble the state of rest or sleep (Funderburk and Case[3], Longo and coworkers[5]).

On the other hand, Bonnet and Bremer[6] have been able since 1937 to demonstrate a cortical action of Ac when injected by the carotid route, which was described as an increase in the amplitude and frequency of the

[1] W. Feldberg, Brit. Med. Bull. *6*, 312 (1950).

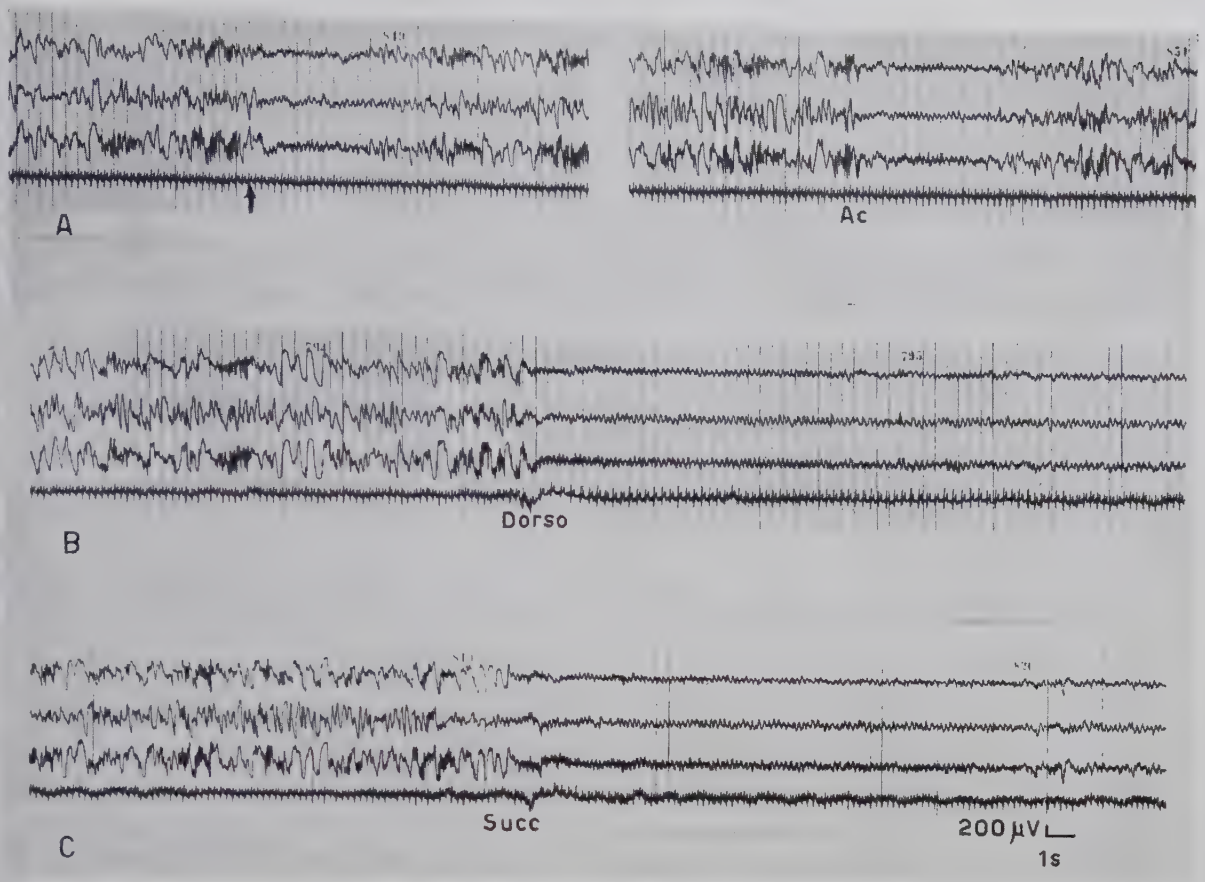
[2] W. C. Wescoe, R. E. Green, B. P. Mc Namara, and S. Krop, J. Pharmacol. *92*, 63 (1948).

[3] H. W. Funderburk and T. J. Case, E.E.G. Clin. Neurophysiol. *3*, 213 (1951).

[4] P. B. Bradley and J. Elkes, J. Physiol. *120*, 14P (1953).

[5] V. G. Longo, G. P. Von Berger, and D. Bovet, J. Pharmacol. *111*, 349 (1954).

[6] V. Bonnet and F. Bremer, C. r. Soc. Biol. *126*, 1271 (1937).



A. Analogy between cortical response (arousal reaction) to hand clap (arrow) and to the endocarotid injection of 0·2 µg of Acetylcholine (Ac). – *B* and *C*. More sustained arousal reaction to tactile stimuli: touching the back (Dorso) and to endocarotid injection of Succinylcholine (5 µg). Normal rabbits. Leads from top to bottom: Left frontoparietal. Left parieto-occipital. Right fronto-parietal. Control electrocardiogram.

spontaneous cortical potentials with prolongation of the afterdischarge of responses arising from the acoustic area after sound stimuli. MORUZZI[1] confirmed these results and in addition described a lowering of the threshold of faradic excitability of the cortex.

As far as the mechanism of action is concerned, it may be that acetylcholine interacts at the cortical level in consequence of a non-specific generalized impulse originating in the thalamus (diffuse projection thalamic system), and that this could be responsible for the fast activity that can be recorded in the cortex during the "arousal reaction". The same activity can be induced by administering eserine by the intravenous or intracarotid route (FUNDERBURK and CASE[2], BREMER and CHATONNET[3]) or by the deposition of Ac on the cortex treated with anti-cholinesterastic drugs (CHATFIELD and DEMPSEY[4]). MILLER and co-workers[5], using strong concentrations of Ac *in loco*, were able to observe superimposition of spikes over this fast activity; spiking, however, was abolished after the cutting of thalamic radiations.

[1] G. MORUZZI, Arch. Int. Physiol. *49*, 33 (1939).

[2] H. W. FUNDERBURK and T. J. CASE, E.E.G. Clin. Neurophysiol. *3*, 213 (1951).

[3] F. BREMER and J. CHATONNET, Arch. Int. Physiol. *57*, 106 (1949).

[4] P. D. CHATFIELD and F. W. DEMPSEY, Amer. J. Physiol. *135*, 633 (1942).

[5] F. R. MILLER, G. W. STAVRAKY, and G. A. WOONTON, J. Neurophysiol. *3*, 131 (1940).

It could thus be argued that this fast activity is of acetylcholinic origin: this may be shown by the fact that under the influence of atropine and other parasympatholytic drugs the fast waves in the cortex are no longer induced (LONGO[1]).

A description is given of the results obtained by centrifugal intracarotid injection of acetylcholine in the rabbit, whose cortical activity was recorded.

In order to avoid any action on the reflexogenic carotid area, the vagus nerve was first cut and the superior cervical ganglion removed; enervation of the carotid body by the HEYMANS[2] method was then carried out; a cannula of polyvinyl resin was introduced into the internal carotid and ligatured above the bifurcation. Small doses of heparin were administered in order to keep the cannula clear. All the products were diluted in physiological saline and the quantity of liquid injected was kept constant (0·2 cm³). Several central injections of saline were always made during the performance of the single experiments.

The electro-encephalographic changes can be recorded in the normal rabbit or in the rabbit curarized with Flaxedil and given artificial respiration to avoid artefacts induced by movements. A similar reaction to that induced by external stimuli (arousal reaction) is seen

[1] V. G. LONGO, Rendiconti Ist. Sup. Sanità (in press).

[2] C. HEYMANS, J. J. BOUCKAERT, and L. DAUTREBANDE, C. r. Soc. Biol. *109*, 556 (1932).

after the injection of acetylcholine in doses varying, according to the sensitivity of the animal, from 0·1 to 1·0 μg. The drug also induces motor responses proportional to the dose, varying from torsion spasm towards the injected side, to flight movements.

Product	Dose provoking arousal reaction on the ECG when injected endocarotid*.
Acetylcholine bromide	0·1–0·5
Tetramethylammonium iodide . .	0·5–1
Decamethonium iodide	2–5
Succinylcholine cloride	3–7
d-Tubocurarine cloride	10–20
Tetraethylammonium iodide . . .	Ineffective (200)
Hexamethonium bromide	Ineffective (200)
Flaxedil iodide.	Ineffective (200)

* Total dose expressed in μg of weight of free base.

The atropinized rabbit (1–3 mg/kg) does not show the "arousal reaction" to external stimuli (Funderburk and Case[1]); intra-carotid injections of Ac can only give the awakening reaction picture on the tracing with larger doses (5–10 μg). The motor reaction, however, is always present, even when the cortical reaction is completely absent.

The results described above, which illustrate an action of acetylcholine achieved with doses even inferior to those needed to produce pharmacological effects at the level of the autonomic ganglia or the neuro-muscular junction, support the conception of a cholinergic mechanism of "activation" at the level of the central nervous system.

Experiments carried out with other drugs, however, have shown that the same cortical response could be obtained with other cholinergic substances, using higher doses. The results obtained are tabulated. It will be observed that the active products have, in common with Ac, a quaternary nitrogen, linked with methyl groups, and that the stimulating properties occur independently of the type of cholinergic action shown in other systems.

V. G. Longo

Laboratory of Therapeutical Chemistry, Istituto Superiore di Sanità, Rome, August 2, 1954.

[1] H. W. Funderburk and T. J. Case, E.E.G. Clin. Neurophysiol. *3*, 213 (1951).

Résumé

L'injection endocarotidienne centrifuge d'acétylcholine provoque chez le lapin, déjà sensible à la dose de 0,1–0,5 μg, une réponse motrice consistant en un spasme de torsion du côté injecté et, aux doses élevées, en une réaction de fuite.

Le tracé électroencéphalographique correspondant montre une réaction analogue à la «réaction d'arrêt» provoquée par des stimuli extérieurs.

A coté de l'acétylcholine, d'autres substances exercent des effects semblables: hydrate de tétraméthylammonium (1–2 μg); décaméthonium (2–5 μg); succinylcholine (3–7 μg); d-tubocurarine (5–10 μg). L'hydrate de tétraéthylammonium, l'hexamethonium, et le Flaxédil sont par contre sans effet jusque à la dose de 200 μg.

Nouveaux livres - Buchbesprechungen - Recensioni - Reviews

Exercises in Theoretical Statistics

With Answers and Hints on Solutions

Von M. G. Kendall
179 Seiten
(Verlag Charles Griffin & Co., Ltd., London, 1954)
(£1)

Der bekannte Autor des zweibändigen Handbuches «Advanced Theory of Statistics» bietet in seinem neuen Werk eine Sammlung von 400 sorgfältig ausgewählten Aufgaben. Sie beziehen sich auf die folgenden Teilgebiete der theoretischen Statistik: Theorie der Verteilungen, Stichprobenlehre, Korrelation, Theorie der Schätzungen, Zeitreihen. Die Aufgaben stammen zur Hauptsache aus Examensarbeiten an englischen Universitäten, zum kleineren Teil aus Originalarbeiten. Da neben leichteren auch ziemlich schwierige Aufgaben aufgenommen sind, so ist es zu begrüssen, dass in einem Anhang Hinweise zum Anpacken der Aufgaben sowie ihre Lösungen gegeben werden.

Während sich in den angelsächsischen Ländern viele hervorragende Mathematiker mit dem weitverzweigten Gebiet der modernen Statistik beschäftigen, ist es auf dem europäischen Festland noch etwas still geblieben. Leider halten hier Vorurteile und mangelndes Interesse die meisten Mathematiker davon ab, sich auf eine Materie einzulassen, die für theoretische und für praktische Forschung gleichermassen aussichtsreich ist. Die vorliegende Aufgabensammlung ist dazu berufen, helfend einzugreifen. Der Leser, der sich in die Methoden der mathematischen Statistik einarbeiten möchte, kann sich sein Studium viel anregender gestalten. Auch zur Verwendung in einem Seminar für vorgerückte Studenten kann das Buch bestens empfohlen werden.

E. Batschelet

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

STUDIORUM PROGRESSUS

Eine praktische Transformationsmethode zwischen trichromatischen und Vollfarbkoordinaten

Von R. Rometsch und K. Miescher[1], Basel

1. Auswahl von Farbkoordinaten

Zur psychophysischen Charakterisierung einer Körperfarbe sind bekanntlich drei Kennzahlen erforderlich, die zweckmässig aus dem Remissionsspektrum zu ermitteln sind. Dabei ergeben sich zwei verschiedene Aufgaben: einerseits sind unter einer ganzen Anzahl möglicher Kennzahlentripel[2] die für den praktischen Gebrauch geeignetsten auszuwählen, und ihre gegenseitige Transformierbarkeit ist aufzuzeigen, anderseits ist eine empfindungsgemäss richtige Stufung vorzunehmen. Ersteres ist Gegenstand der «Mischmetrik», die auch «*Reizmetrik*» (Luther[2]) oder «*niedere* Farbmetrik» (Schrödinger[3]) genannt wird und auf dem Prinzip der geraden Mischlinien beruht. Letzteres gehört dagegen zum Gebiet der «Stufenmetrik» oder der «höheren Farbmetrik» im Sinne Schrödingers. Hierüber soll in einer folgenden, ausführlicheren Publikation im Zusammenhang mit der Aufstellung eines symmetrischen Urfarbenkreises berichtet werden[4]. Die vorliegende Arbeit ist als Beitrag zur Mischmetrik gedacht.

Das heute gebräuchlichste mischmetrische System, das 1931 von der internationalen Beleuchtungskommission zur Norm bestimmte trichromatische, setzt jede Farbe additiv aus drei festgelegten Grundfarben Rot (X), Grün (Y) und Blau (Z) zusammen, deren Beträge aus dem Remissionsspektrum, der gewünschten Beleuchtungsfunktion und den Normvalenzen der Spektralfarben abgeleitet werden können. Da wir psychologisch sicherlich eine Farbe nicht nach ihrem Rot-, Grün- und Blauwert beurteilen, ergab sich von Anbeginn der Wunsch nach einer anschaulicheren Kennzeichnung. Hiefür schlug Helmholtz Farbton, Sättigung und Helligkeit (oder Leuchtdichte) vor[5]. Eine andere dazu auf den ersten Blick gegensätzliche, sehr interessante Gruppe «psychologischer» Kennzahlen geht auf Ostwald[6] zurück, der jede Körperfarbe als additive Mischung von Weiss, Schwarz und Vollfarbe bestimmten Farbtons darstellt. Beiden Kennzahlgruppen gemeinsam ist – im Gegensatz zum trichromatischen System – der Bezug auf eine einzige Vergleichsfarbe bestimmten Farbtons, der zum Beispiel durch die Wellenlänge der betreffenden Spektralfarbe oder die Nummer in einem Farbtonkreis festgelegt wird.

Im Verlauf von Vorarbeiten für die Aufstellung eines neuen Farbsystems hat Richter[1] vor einigen Jahren experimentell festzustellen versucht, welche von den beiden «psychologischen» Kennzahlgruppen der durchschnittlichen «natürlichen» Farbbetrachtungsweise besser entspricht. Er liess 40 unvoreingenommene Versuchspersonen 10 beliebig ausgewählte Farben beschreiben und übersetzte dann die Aussagen in die Terminologie der Farbenlehre. Es ergaben sich zwei gleich grosse Gruppen, von denen die eine nach *Helmholtz-Begriffen*, die andere nach *Ostwald-Begriffen* urteilte. Eine Verfeinerung des Versuches, indem nach der Gleichwertigkeit von Farben gleichen Schwarz- und Weissgehalts gefragt wurde, führte ebenfalls nicht zu eindeutigen Ergebnissen.

Tatsächlich wäre es von Vorteil, wenn man die beiden so gegensätzlich erscheinenden Begriffsgruppen nebeneinander benützen und je nach Problemstellung die einen oder anderen Kennzahlen verwenden könnte; denn, wie der Richtersche Versuch zeigt, sind sie im Grunde genommen *gleichwertig*.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen der Kennzeichnung einer Körperfarbe durch Helmholtz oder Ostwald besteht darin, dass sie zweierlei Bezugsfarben verwenden. Helmholtz benützt hiezu Spektralfarben, Ostwald aber die Vollfarben; beide sind durch gewisse Maximalbedingungen ausgezeichnet. Bezieht man dagegen die zwei Koordinatensysteme auf dieselben Reinfarben, so ergeben sich, wie Miescher bereits 1925 erkannte[2], sehr einfache Zusammenhänge. Dabei weisen zur Bezeichnung der Körperfarben gerade die Vollfarben besondere Vorzüge auf.

Miescher[3] wie auch Richter[4] haben Transformationsformeln für die Umwandlung von trichromatischen in Ostwaldsche Vollfarbmasszahlen mitgeteilt, wobei damals die darin auftretenden trichromatischen Koordinaten der Vollfarben für energiegleiches Spektrum berechnet wurden. Später gaben Foss, Nickerson und Granville[5] in einer Analyse des Ostwald-Systems die trichromatischen Koordinaten von 29 Paaren komplementärer Vollfarben an, bezogen auf die inzwischen eingeführte Normlichtart C, sowie von 44 Mischungen davon mit Weiss und Schwarz entsprechend den Ostwald-Normen a, c, e, g, i, l, n und p. Die mitgeteilten Tabellen sind vorzüglich geeignet für die Umwandlung von Ostwald- in trichromatische Koordinaten, nicht jedoch für die umgekehrte Transformation, wozu man mit Hilfe von umfangreichen graphischen Darstellungen in drei Dimensionen interpolieren muss. Die heutige apparative Technik stellt aber gerade das umgekehrte Problem; denn mit den modernen selbstregistrierenden Spektralphotometern, zum Beispiel demjenigen nach Hardy[6], erhält man innert 3 min genaue Remissionskurven, in Kombination mit dem automatischen Integrator von

[1] Wissenschaftliche Laboratorien der CIBA-Aktiengesellschaft, Basel.

[2] Siehe zum Beispiel R. Luther, Z. techn. Phys. *8*, 540 (1927).

[3] E. Schrödinger, *Die Gesichtsempfindungen*, in: Müller-Pouillets, *Lehrbuch der Physik*, 11. Aufl., Bd. 2, Teil 1 (Verlag Vieweg, Braunschweig 1926), S. 456–560. Siehe auch Ann. Physik [4] *63*, 397, 489 (1920).

[4] Über Vorarbeiten siehe K. Miescher, Helv. physiol. Acta *6*, C 12–13 (1948); Verh. schweiz. naturforsch. Ges. *1949*, 125; Chimia *3*, 243 (1949).

[5] H. v. Helmholtz, *Handbuch der Physiologischen Optik*, 2. Bd., 3. Aufl. (Verlag Voss, Hamburg und Leipzig, 1911), S. 109. Schon J. Newton ordnete die Farbtöne im Kreise an, in dessen Mittelpunkt er Weiss verlegte. Die Sättigung der Farbe charakterisiert er durch ihren Abstand vom Weisspunkt. [J. Newton, *Optik* (1704); *Ostwalds Klassiker der exakten Wissenschaften*, Nr. 96, S. 100.]

[6] W. Ostwald, *Die Farbenfibel* (Verlag Unesma, Leipzig 1934) und zahlreiche andere Werke zur Farbenlehre.

[1] M. Richter, Z. wiss. Photogr. *45*, 139 (1950).

[2] K. Miescher, Z. Sinnesphysiol. *57*, 46 (1925).

[3] K. Miescher, Z. techn. Physik *11*, 233 (1930).

[4] M. Richter, Z. techn. Physik *12*, 582 (1931); siehe auch M. Richter, *Grundriss der Farbenlehre* (Verlag Theodor Steinkopf, Dresden und Leipzig 1940), S. 108, 212.

[5] C. F. Foss, D. Nickerson und W. C. Granville, J. Opt. Soc. Amer. *34*, 361 (1944).

[6] A. C. Hardy, J. Opt. Soc. Amer. *18*, 96 (1929); vgl. auch J. L. Michaelson, J. Opt. Soc. Amer. *28*, 365 (1938).

Davidson und Imm[1] gleichzeitig auch die trichromatischen Koordinaten.

Entsprechende Apparaturen zur direkten Bestimmung der Ostwald-Kennzahlen mit gleicher Genauigkeit sind unseres Wissens nicht erhältlich. Wir haben deshalb ein praktisches Transformationsschema entwickelt, das gestattet, mit einer einzigen graphischen oder rechnerischen Interpolation aus den trichromatischen Masszahlen Vollfarbkoordinaten in Ostwaldscher oder Helmholtzscher Ausdrucksweise zu berechnen.

2. *Definition der Vollfarben und der davon abgeleiteten Koordinaten*

Stellen Spektralfarben Farben physikalisch grösstmöglicher Sättigung dar, so kommt den Vollfarben nach Miescher das grösste «Reinfarbgewicht» zu[2]. Sie weisen bei gegebener Beleuchtung eine maximale Quantität des betreffenden Farbtons auf und erfordern von allen theoretisch möglichen farbtongleichen Körperfarben ein Maximum an Gegenfarbe zu ihrer Neutralisierung. Es sind «maximale» Optimalfarben im Sinne von Schrödinger[3], Luther[4] und Rösch[5] mit höchstens zwei Sprungstellen im Spektrum.

Wie schon Ostwald darauf hingewiesen hat, stehen die Vollfarben mit ihren breiten Spektren den üblichen Körperfarben näher als die Spektralfarben; ausserdem vermögen sie die «Purpurlücke» des Spektrums (nahezu ein Viertel des Farbkreises) mühelos zu überbrücken. Daher rührt auch ihre besondere Eignung als einheitliche Bezugsgrössen der Koordinatensysteme nach Ostwald oder Helmholtz.

Die Definition der Vollfarbkoordinaten, die auch den Darlegungen von Foss, Nickerson und Granville[1] zugrunde liegt, beruht auf den Grassmannschen Gesetzen und lautet: Für beliebige Farben, deren Remissionskurven (*a* und *a'*) gemäss den beiden Beispielen der Abbildungen 1 und 2 gegeben seien, können wir immer eindeutig zugeordnete «*metamere*» oder «*bedingt-gleiche*» Farben finden, deren Remissionskurven (*b* und *b'*) durch nur zwei konstante Werte und höchstens zwei Sprungstellen gekennzeichnet sind, wobei die zwei Sprungstellen entweder bei (für die gegebene Beleuchtungsart) komplementären Wellenlängen liegen oder, wo dies nicht möglich ist, die eine Sprungstelle im langwelligen bzw. kurzwelligen Spektrumsende verschwindet. Der kleinere der beiden konstanten Remissionswerte ist dann gleich dem Weissanteil w der vorgegebenen Farbe, die Differenz zwischen dem kleineren und dem grösseren gleich dem Vollfarbanteil v und die Differenz zwischen dem grösseren und hundert gleich dem Schwarzanteil s.

Sind die beiden konstanten Remissionswerte im idealen Grenzfall Null und Hundert, Weiss- und Schwarzanteil also gleich Null, dann liegen Vollfarben vor. Dabei lassen sich nach Schrödinger[2] vier verschiedene Typen idealisierter Körperfarben mit Vollfarbcharakter unterscheiden, je nach der Lage der Grenzwellenlängen im Spektrum (vgl. dazu Abb. 5 und 6).

1. Farben, die zwischen zwei, bei gegebener Beleuchtung komplementären Wellenlängen alles Licht reflektieren, den Rest des Spektrums jedoch vollständig absorbieren (Mittelpigmente).

1C. Farben, die zwischen zwei, bei gegebener Beleuchtung komplementären Wellenlängen alles Licht absorbieren, den Rest des Spektrums jedoch vollständig reflektieren (Mittelfehlpigmente). Diese Vollfarben sind komplementär zu den unter 1. genannten.

2. Farben, die vom langwelligen Spektrumsende bis zu Wellenlängen im mittleren Teil des Spektrums, für die es bei gegebener Beleuchtungsart keine Komplementärwellenlängen gibt, alles Licht reflektieren und den Rest des Spektrums vollständig absorbieren (Langendpigmente).

2C. Farben, die vom kurzwelligen Spektrumsende ebenfalls bis zu Wellenlängen, für die es bei gegebener Beleuchtungsart keine Komplementärwellenlängen gibt, alles Licht reflektieren und den Rest des Spektrums vollständig absorbieren (Kurzendpigmente). Diese Vollfarben sind komplementär zu den unter 2 genannten.

3. *Zentrierte Normfarbwerte der Vollfarben*

Zur Ermittlung der trichromatischen Normfarbwerte[3] X_v, Y_v

[1] H. R. Davidson und L. W. Imm, J. Opt. Soc. Amer. *39*, 942 (1949).
[2] K. Miescher, Z. Sinnesphysiol. *57*, 78 (1925).
[3] E. Schrödinger, Ann. Phys. [4] *62*, 603 (1920).
[4] R. Luther, Z. techn. Physik *8*, 540 (1927).
[5] S. Rösch, Physik. Z. *29*, 83 (1928).

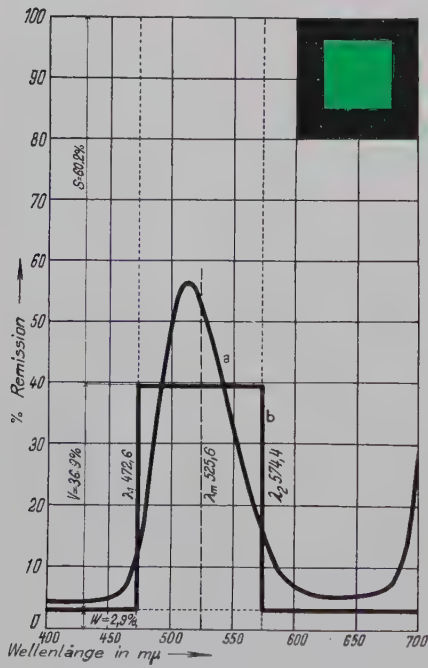


Abb. 1. *a* Remissionskurve der grünen Färbung höchstmöglicher Sättigung. – *b* Remissionskurve einer dazu metameren Farbe, dargestellt als Mischung von farbtongleicher Vollfarbe (36,9%), Weiss (2,9%) und Schwarz (60,2%). λ_1 und λ_2 Grenzwellenlängen der farbtongleichen Vollfarbe. λ_m Wellenlänge der farbtongleichen Spektralfarbe.

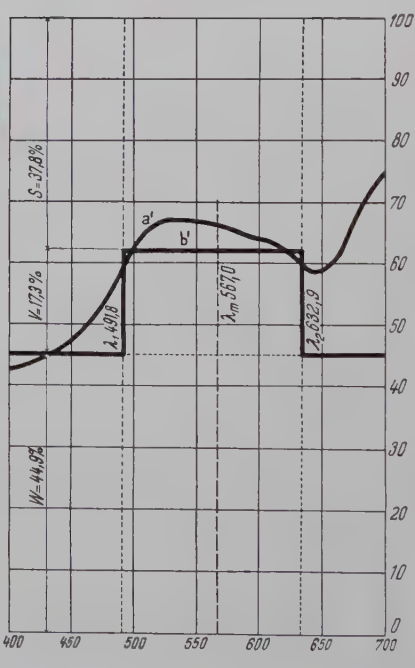


Abb. 2. *a'* Remissionskurve der hellgelbgrünen Farbe der Umschlagsseite dieser Zeitschrift. – *b'* Remissionskurve einer dazu metameren Farbe, dargestellt als Mischung von farbtongleicher Vollfarbe (17,3%), Weiss (44,9%) und Schwarz (37,8%). λ_1 und λ_2 Grenzwellenlängen der farbtongleichen Vollfarbe. λ_m Wellenlänge der farbtongleichen Spektralfarbe.

[1] C. F. Foss, D. Nickerson und W. C. Granville, J. Opt. Soc. Amer. *34*, 361 (1944).
[2] E. Schrödinger, Ann. Phys. [4] *62*, 603 (1920).
[3] Es sind hier die im Entwurf zum neuen Deutschen Normblatt für Farbmessung, DIN 5033, Blatt 2, vorgeschlagenen Ausdrücke verwendet.

und Z_v der Vollfarben sind jeweils die Normspektralwerte $\bar{x}$, $\bar{y}$ und $\bar{z}$, multipliziert mit den zugehörigen Werten der gewählten Beleuchtungsfunktion E_λ, das heisst die Normfarbwerte der Spektralfarben, über die Gebiete mit der Remission = 1 zu integrieren.

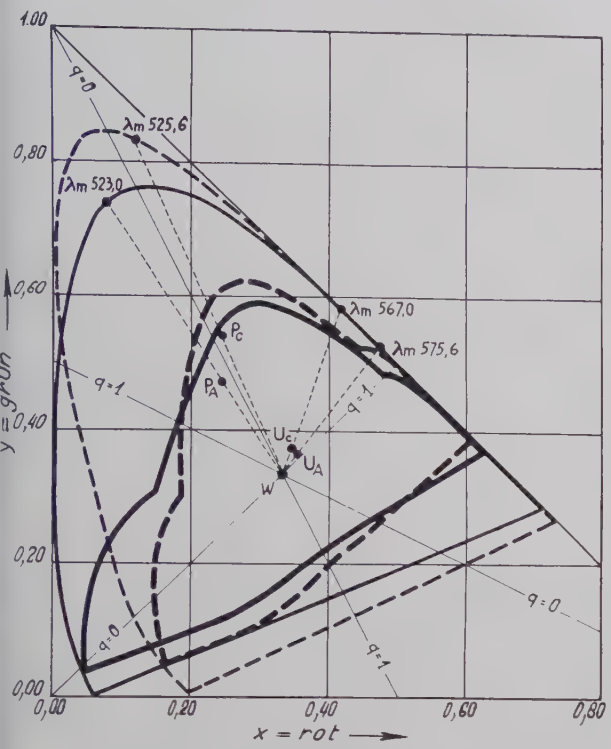


Abb. 3. Spektralfarbenzüge und Vollfarbenzüge im auf die Normlichtarten A (ausgezogen) bzw. C (gestrichelt) zentrierten IBK-Dreieck. W = Mittelpunkt = Beleuchtungspunkt. P_A und P_C Farbpunkte der tiefgrünen Färbung, U_A und U_C Farbpunkte des hellgelbgrünen Umschlags dieser Zeitschrift bei den Normlichtarten A und C.

Da die additive Mischung gleicher Anteile zweier Gegenvollfarben, unabhängig von ihrer Lage, das ganze Spektrum umfasst, ergänzen sich ihre Normfarbwerte zu denjenigen einer ideal weissen Fläche, die mit den Normfarbwerten der angewandten Lichtart identisch sind. Sie fallen nur für die von der «Deutschen Lichttechnischen Gesellschaft» früher vorgeschlagene, aber international nicht anerkannte Normlichtart E mit den Koordinaten von trichromatisch definiertem Weiss, $X_W = Y_W = Z_W = 1$ (Mittelpunkt der Farbtafel), zusammen. Für Normlichtart A (Glühlampenlicht) gilt[1] $X_W = 1{,}1852$, $Y_W = 1{,}0790$, $Z_W = 0{,}3838$ und für Normlichtart C (Tageslichtersatz) $X_W = 1{,}0439$, $Y_W = 1{,}0647$, $Z_W = 1{,}2579$.

Um nun die Umrechnungsformeln für Vollfarbkoordinaten nicht mit den für jede Lichtart verschiedenen Koordinaten von Weiss zu belasten, transformieren wir sämtliche Normfarbwerte von vornherein so, dass der Farbort der Lichtart in den Koordinatenmittelpunkt der trichromatischen Farbtafel (Abb. 3) verschoben wird und den Koordinaten der ideal weissen Fläche unabhängig von der Lichtart der Wert 1 zukommt. Man erhält damit neue, «zentrierte» Koordinaten X^*, Y^* und Z^*, die sich aus den nach üblichen Methoden ermittelten Normfarbwerten X, Y und Z ergeben, indem man durch die Normfarbwerte der Lichtart dividiert[1]; es wird somit für

Normlichtart A	Normlichtart C
$X^* = 0{,}8437\ X$	$X^* = 0{,}9579\ X$
$Y^* = 0{,}9269\ Y$	$Y^* = 0{,}9392\ Y$
$Z^* = 2{,}6055\ Z$	$Z^* = 0{,}7950\ Z$

(1)

Y^* stellt unmittelbar die Helligkeit (Leuchtdichte) der trichromatischen Farbe bei der betreffenden Beleuchtung in Anteilen von 1 dar.

Angewandt auf die im *Handbook of Colorimetry* von HARDY tabellierten *Normfarbwerte der Spektralfarben* ergeben sich mit diesen Transformationen die auf Normlichtart A bzw. C zentrierten, nun je nach Lichtart verschiedenen Spektralfarbenzüge der Abbildung 3.

Zur Gewinnung der eingangs dieses Abschnitts erwähnten Integrale summierten wir die auf *Normlichtart A* zentrierten Normfarbwerte der Spektralfarben für jedes mμ auf, wonach sich die *zentrierten Normfarbwerte der Vollfarben* ohne weiteres als Differenzen zwischen den Summenwerten für die Grenzwellenlängen ablesen liessen. Das Ergebnis für einen geschlossenen Farbtonkreis ist in Tabelle 1 zusammengefasst. Die Vollfarben der ersten Hälfte des Kreises sind darin, beginnend mit Gelb über Orange, Rot, Violett nach Blau, willkürlich von 1 bis 47 numeriert, die dazu komplementären Vollfarben von Blau über Grün zurück nach Gelb mit 1′ bis 47′. Ausser den zentrierten Normfarbwerten sind die zentrierten Normfarbanteile (Farbtafel-Koordinaten), die durch die Definition der Vollfarben bedingte Typenbezeichnung, die Grenz- und die charakteristischen Wellenlängen angegeben, sowie später zu erörternde, für die Transformation auf Vollfarbkoordinaten wichtige Grössen.

Die entsprechenden Zahlenwerte für Vollfarben unter *Normlichtart C* der Tabelle 2 sind zum grösseren Teil der Arbeit von Foss, NICKERSON und GRANVILLE[2] entnommen und nachträglich zentriert worden. Nur einige Zwischenwerte, die zur Verbesserung der Interpolationsgenauigkeit eingefügt werden mussten, sind nach der oben angegebenen Methode berechnet.

In der Farbtafel, Abbildung 3, sind die beiden Vollfarbenzüge gemäss den Normlichtarten A und C wiedergegeben.

4. *Transformation trichromatischer Normfarbwerte in Vollfarbkoordinaten*

Wie aus den Abbildungen 1 und 2 ohne weiteres ersichtlich ist, können die idealisierten Farben b bzw. b' als Summe des Anteils w von Weiss und des Anteils v der Vollfarbe gleichen Farbtons angesehen werden. Unter Berücksichtigung, dass für Idealweiss $X_w^* = Y_w^* = Z_w^* = 1$ gilt, lassen sich demnach die zentrierten trichromatischen Normfarbwerte dieser Farben sehr einfach durch die Gleichungen (2) darstellen[3],

[1] A. C. HARDY, *Handbook of Colorimetry* (The Technology Press, Cambridge, Mass., USA. 1936–1948), S. 49.

[1] Die mit dem automatischen Integrator des Hardy-Spektrophotometers auf Normlichtart C bezogenen Koordinaten X', Y' und Z' entsprechen den Quotienten:

$$X' = \frac{X}{1{,}0647}, \quad Y' = \frac{Y}{1{,}0647} \quad \text{und} \quad Z' = \frac{Z}{1{,}0647}.$$

Hieraus sowie aus (1) folgt

$$X^* = 1{,}0199\ X', \quad Y^* = Y' \quad \text{und} \quad Z^* = 0{,}8464$$

(für Normlichtart C). – Diese «Zentrierungs»-Transformation wird auch im DIN-Normblatt 5033, Abschnitt 7.6, empfohlen.

[2] C. F. Foss, D. NICKERSON und W. C. GRANVILLE, J. Opt. Soc. Amer. *34*, 361 (1944).

[3] Im folgenden werden zur Erleichterung des Überblicks sämtliche Vollfarbkoordinaten in Prozent ausgedrückt, alle übrigen Koordinaten als Anteile von 1.

Tabelle I.–Zentrierte trichromatische Koordinaten der Vollfarben bei Normlichtart A.

Typ	Nr.	S	q	λ_m	λ_1	λ_2	X^*	Y^*	Z^*	A_v–C_v	x^*	y^*
2	1		**1,0000**	581,6	507,4		0,9510	0,9510	0,0531	**0,8979**	0,4864	0,4864
	2		**0,9917**	582,0	510,0		0,9509	0,9434	0,0456	**0,9053**	0,4902	0,4863
	3		**0,9516**	583,4	520,0		0,9490	0,9043	0,0251	**0,9239**	0,5052	0,4814
	4		**0,9267**	584,5	525,0		0,9464	0,8784	0,0186	**0,9278**	0,5134	0,4765
	5		**0,9052**	585,4	529,0		0,9429	0,8549	0,0145	**0,9284**	0,5203	0,4717
	6		**0,8705**	587,0	535,0	740,0	0,9352	0,8154	0,0099	**0,9253**	0,5312	0,4632
	7		**0,8398**	588,5	540,0		0,9260	0,7788	0,0072	**0,9188**	0,5409	0,4549
	8		**0,7753**	591,8	550,0		0,8988	0,6977	0,0040	**0,8948**	0,5616	0,4359
	9		**0,7092**	595,7	560,0		0,8570	0,6085	0,0025	**0,8545**	0,5838	0,4145
	10		**0,6765**	598,1	565,0		0,8296	0,5619	0,0021	**0,8275**	0,5953	0,4032
	11		**0,6446**	600,4	570,0		0,7976	0,5147	0,0017	**0,7959**	0,6070	0,3917
	12	I	**0,5905**	605,6	579,00	380,0	0,7276	0,4302	0,0013	**0,7263**	0,6277	0,3712
1c	13		**0,5731**	607,2	579,05	420,0	0,7290	0,4298	0,0281	**0,7009**	0,6142	0,3621
	14		**0,5567**	609,4	579,08	425,0	0,7303	0,4296	0,0520	**0,6783**	0,6026	0,3545
	15		**0,5283**	613,0	579,12	430,0	0,7325	0,4293	0,0897	**0,6428**	0,5853	0,3430
	16		**0,4851**	620,5	579,18	435,0	0,7353	0,4289	0,1402	**0,5951**	0,5637	0,3288
	17		**0,4231**	644,0	579,26	440,0	0,7386	0,4284	0,2009	**0,5377**	0,5400	0,3132
	18		**0,3741**	– 504,2	579,32	443,0	0,7406	0,4281	0,2413	**0,4993**	0,5252	0,3036
	19		**0,3352**	– 504,8	579,36	445,0	0,7421	0,4279	0,2695	**0,4726**	0,5155	0,2973
	20		**0,2646**	– 505,8	579,44	448,0	0,7442	0,4274	0,3134	**0,4308**	0,5011	0,2878
	21		**0,2078**	– 506,5	579,50	450,0	0,7455	0,4271	0,3436	**0,4019**	0,4917	0,2817
	22		**0,1016**	– 507,8	579,59	453,0	0,7475	0,4266	0,3903	**0,3572**	0,4778	0,2727
	23		**0,0591**	– 508,2	579,63	454,0	0,7481	0,4264	0,4062	**0,3419**	0,4733	0,2698
	24		**0,0119**	– 508,7	579,67	455,0	0,7487	0,4262	0,4223	**0,3264**	0,4688	0,2668
	25		**0,0000**	– 508,8	579,68	455,235	0,7489	0,4261	0,4261	**0,3228**	0,4677	0,2661
	26	II	**0,2417**	– 511,3	579,90	460,0	0,7514	0,4250	0,5039	**0,3264**	0,4472	0,2529
	27		**0,5594**	– 515,9	580,30	466,4	0,7536	0,4229	0,6079	**0,3307**	0,4223	0,2370
	28		**0,7438**	– 519,8	580,70	470,4	0,7530	0,4205	0,6678	**0,3325**	0,4090	0,2284
	29		**0,9418**	– 526,1	581,40	475,1	0,7496	0,4161	0,7302	**0,3335**	0,3954	0,2195
	30		**1,0000**	– 528,3	581,68	476,56	0,7478	0,4142	0,7478	**0,3336**	0,3916	0,2169
	31		**0,9297**	– 531,2	582,15	478,50	0,7444	0,4110	0,7696	**0,3586**	0,3867	0,2135
	32		**0,8866**	– 533,3	582,5	479,90	0,7417	0,4087	0,7843	**0,3756**	0,3834	0,2112
	33		**0,8405**	– 535,6	583,0	481,55	0,7376	0,4052	0,8007	**0,3955**	0,3795	0,2085
	34		**0,8051**	– 537,7	583,5	482,95	0,7334	0,4016	0,8137	**0,4121**	0,3764	0,2061
	35		**0,7563**	– 540,6	584,4	485,05	0,7253	0,3951	0,8317	**0,4366**	0,3715	0,2024
	36		**0,7155**	– 543,7	585,4	486,95	0,7160	0,3878	0,8465	**0,4587**	0,3671	0,1988
	37		**0,6177**	– 550,0	589,0	491,65	0,6804	0,3610	0,8781	**0,5171**	0,3545	0,1881
	38	III	**0,5432**	– 555,0	593,0	494,82	0,6379	0,3311	0,8959	**0,5648**	0,3421	0,1775
	39		**0,4543**	– 560,3	599,0	497,78	0,5705	0,2876	0,9103	**0,6227**	0,3226	0,1626
	40		**0,4279**	– 561,9	601,0	498,49	0,5475	0,2737	0,9136	**0,6399**	0,3156	0,1578
	41		**0,3211**	– 567,7	610,0	500,73	0,4426	0,2154	0,9230	**0,7076**	0,2799	0,1362
	42		**0,2234**	– 572,2	620,0	502,03	0,3322	0,1608	0,9281	**0,7673**	0,2338	0,1132
	43		**0,1486**	– 575,6	630,0	502,74	0,2391	0,1184	0,9308	**0,8124**	0,1856	0,0919
	44		**0,0951**	– 577,8	640,0	503,18	0,1685	0,0882	0,9325	**0,8443**	0,1417	0,0742
	45		**0,0593**	442,0	650,0	503,44	0,1192	0,0679	0,9335	**0,8656**	0,1064	0,0606
	46		**0,0370**	465,0	660,0	503,58	0,0879	0,0554	0,9340	**0,8786**	0,0816	0,0514
2c	47		**0,0100**	474,0	740,0	503,75	0,0491	0,0402	0,9346	**0,8944**	0,0480	0,0393

$$X^* = \frac{v}{100} \cdot X_v^* + \frac{w}{100},$$
$$Y^* = \frac{v}{100} \cdot Y_v^* + \frac{w}{100}, \qquad (2)$$
$$Z^* = \frac{v}{100} \cdot Z_v^* + \frac{w}{100},$$

worin X_v^*, Y_v^* und Z_v^* die zentrierten trichromatischen Normfarbwerte der Vollfarben bedeuten und aus den Tabellen 1 bzw. 2 zu entnehmen sind.

Die Normfarbwerte der idealisierten Farben b und b' sind nun andererseits identisch mit denjenigen der realen Farben a bzw. a', entsprechend der Grassmannschen Forderung, wonach metameren oder bedingt-gleichen Farben, das heisst Farben gleichen Aussehens, aber verschiedenen Remissionsverlaufs, unter gleicher Beleuchtung dieselben trichromatischen Normfarbwerte zukommen. Der gesuchte Zusammenhang zwischen den Ostwaldschen Vollfarbkoordinaten w und v und den durch Integration der Produkte aus Remissionswert, Normspektralwert und Beleuchtungsfunktion über das ganze Remissionsspektrum ermittelten Normfarbwerte ist somit durch die Gleichungen (2) gegeben.

Zur Auflösung des Gleichungssystems (2) nach v und w ist es von Vorteil, immer diejenigen zwei Gleichungen auszuwählen, die die grösste und kleinste der trichromatischen Koordinaten betreffen, da dadurch die höchste Genauigkeit erzielt und der Unbestimmtheit am Schnittpunkt der Summenkurven von $E\,\bar{x}$ und $E\,\bar{y}$ automatisch ausgewichen wird. Wir ersetzen deshalb X^*, Y^* und Z^* durch A, B und C sowie die Vollfarbkoordinaten X_v^*, Y_v^* und Z_v^* durch A_v, B_v und C_v, mit der Bedingung, dass A bzw. A_v immer der grösste und C bzw. C_v immer der kleinste der zentrierten Normfarbwerte sein soll[1]. Es wird dann allgemein:

[1] Diese Beziehung soll nur für zentrierte Normfarbwerte gelten womit wir auch auf die Zentrierungsindizes * verzichten können.

Tabelle I.–Zentrierte trichromatische Koordinaten der Vollfarben bei Normlichtart A

Typ	Nr.	S	q	λ_m	λ_1	λ_2	X^*	Y^*	Z^*	A_v–C_v	x^*	y^*
	1′		**0,0000**	476,0		507,4	0,0490	0,0490	0,9469	**0,8979**	0,0469	0,0469
	2′		**0,0083**	477,7		510,0	0,0491	0,0566	0,9544	**0,9053**	0,0463	0,0534
	3′		**0,0484**	482,9		520,0	0,0510	0,0957	0,9749	**0,9239**	0,0455	0,0853
	4′		**0,0733**	485,3		525,0	0,0536	0,1216	0,9814	**0,9278**	0,0463	0,1051
	5′		**0,0948**	487,1		529,0	0,0571	0,1451	0,9855	**0,9284**	0,0481	0,1222
2c	6′		**0,1295**	489,3		535,0	0,0648	0,1846	0,9901	**0,9253**	0,0523	0,1489
	7′		**0,1602**	491,1	380,0	540,0	0,0740	0,2212	0,9928	**0,9188**	0,0575	0,1717
	8′		**0,2247**	494,0		550,0	0,1012	0,3023	0,9960	**0,8948**	0,0723	0,2160
	9′		**0,2908**	496,4		560,0	0,1430	0,3915	0,9975	**0,8545**	0,0933	0,2555
	10′		**0,3255**	497,4		565,0	0,1704	0,4381	0,9979	**0,8275**	0,1061	0,2727
	11′		**0,3554**	498,3		570,0	0,2024	0,4853	0,9983	**0,7959**	0,1200	0,2878
	12′	IV	**0,4095**	499,8		579,00	0,2724	0,5698	0,9987	**0,7263**	0,1480	0,3095
	13′		**0,4269**	500,2	420,0	579,05	0,2710	0,5702	0,9719	**0,7009**	0,1495	0,3145
	14′		**0,4433**	500,6	425,0	579,08	0,2697	0,5704	0,9480	**0,6783**	0,1508	0,3190
	15′		**0,4717**	501,2	430,0	579,12	0,2675	0,5707	0,9103	**0,6428**	0,1530	0,3264
	16′		**0,5149**	502,1	435,0	579,18	0,2647	0,5711	0,8598	**0,5951**	0,1561	0,3368
	17′		**0,5769**	503,3	440,0	579,26	0,2614	0,5716	0,7991	**0,5377**	0,1602	0,3502
	18′		**0,6259**	504,2	443,0	579,32	0,2594	0,5719	0,7587	**0,4993**	0,1631	0,3597
	19′		**0,6648**	504,8	445,0	579,36	0,2579	0,5721	0,7305	**0,4726**	0,1653	0,3666
	20′		**0,7354**	505,8	448,0	579,44	0,2558	0,5726	0,6866	**0,4308**	0,1688	0,3780
	21′		**0,7922**	506,5	450,0	579,50	0,2545	0,5729	0,6564	**0,4019**	0,1715	0,3861
	22′		**0,8984**	507,8	453,0	579,59	0,2525	0,5734	0,6097	**0,3572**	0,1759	0,3994
	23′		**0,9409**	508,2	454,0	579,63	0,2519	0,5736	0,5938	**0,3419**	0,1775	0,4041
	24′		**0,9881**	508,7	455,0	579,67	0,2513	0,5738	0,5777	**0,3264**	0,1791	0,4090
	25′		**1,0000**	508,8	455,235	579,68	0,2511	0,5739	0,5739	**0,3228**	0,1795	0,4103
	26′	V	**0,7583**	511,3	460,0	579,9	0,2486	0,5750	0,4961	**0,3264**	0,1884	0,4357
	27′		**0,4406**	515,9	466,4	580,3	0,2464	0,5771	0,3921	**0,3307**	0,2027	0,4747
	28′		**0,2562**	519,8	470,4	580,7	0,2470	0,5795	0,3322	**0,3325**	0,2132	0,5001
1	29′		**0,0582**	526,1	475,0	581,4	0,2504	0,5839	0,2698	**0,3335**	0,2268	0,5288
	30′		**0,0000**	528,3	476,56	581,68	0,2522	0,5858	0,2522	**0,3336**	0,2313	0,5373
	31′		**0,0703**	531,2	478,5	582,15	0,2556	0,5890	0,2304	**0,3586**	0,2378	0,5479
	32′		**0,1134**	533,3	479,9	582,5	0,2583	0,5913	0,2157	**0,3756**	0,2425	0,5551
	33′		**0,1595**	535,6	481,55	583,0	0,2624	0,5948	0,1993	**0,3955**	0,2484	0,5630
	34′		**0,1949**	537,7	482,95	583,5	0,2666	0,5984	0,1863	**0,4121**	0,2536	0,5692
	35′		**0,2437**	540,6	485,05	584,4	0,2747	0,6049	0,1683	**0,4366**	0,2621	0,5772
	36′		**0,2845**	543,7	486,95	585,4	0,2840	0,6122	0,1535	**0,4587**	0,2706	0,5832
	37′		**0,3823**	550,0	491,65	589,0	0,3196	0,6390	0,1219	**0,5171**	0,2958	0,5914
	38′	VI	**0,4568**	555,0	494,82	593,0	0,3621	0,6689	0,1041	**0,5648**	0,3190	0,5893
	39′		**0,5457**	560,3	497,78	599,0	0,4295	0,7124	0,0897	**0,6227**	0,3487	0,5784
	40′		**0,5721**	561,9	498,49	601,0	0,4525	0,7263	0,0864	**0,6399**	0,3577	0,5741
	41′		**0,6789**	567,7	500,73	610,0	0,5574	0,7846	0,0770	**0,7076**	0,3928	0,5529
	42′		**0,7766**	572,2	502,03	620,0	0,6678	0,8392	0,0719	**0,7673**	0,4230	0,5315
	43′		**0,8514**	575,6	502,74	630,0	0,7609	0,8816	0,0692	**0,8124**	0,4445	0,5150
	44′		**0,9049**	577,8	503,18	640,0	0,8315	0,9118	0,0675	**0,8443**	0,4592	0,5035
	45′		**0,9407**	579,3	503,44	650,0	0,8808	0,9321	0,0665	**0,8656**	0,4687	0,4960
	46′		**0,9630**	580,2	503,58	660,0	0,9121	0,9446	0,0660	**0,8786**	0,4744	0,4913
2	47′		**0,9900**	581,1	503,75	740,0	0,9509	0,9598	0,0654	**0,8944**	0,4812	0,4857

$$A = \frac{v}{100} \cdot A_v + \frac{w}{100}\,, \qquad C = \frac{v}{100} \cdot C_v + \frac{w}{100}\,. \tag{3}$$

und nach v und w aufgelöst

$$v = 100\,\frac{A-C}{A_v-C_v}\,,^1 \qquad w = 100\,N - v \cdot N_v = 100\,\frac{A_v\,C - C_v\,A}{A_v - C_v}\,, \tag{4}$$

[1] Nach M. Richter (*Grundriss der Farbenlehre* [Verlag Theodor Steinkopf, Dresden und Leipzig 1940], S. 110) gilt auch

$$v = \frac{M}{M_v} \cdot 100\,,$$

wobei M und M_v die Lutherschen Farbmomente $M = \sqrt{M_1^2 + M_2^2}$ bedeuten. Letztere sind aber umständlicher zu berechnen als die unserer Bestimmung zugrunde liegenden Differenzwerte der Koordinaten. Diese stellen übrigens die trichromatischen «Reinheiten» der Farbprobe und der entsprechenden Vollfarbe dar, siehe K. Miescher, Z. techn. Physik *11*, 66 (1930).

wobei N bzw. N_v für irgendeinen der drei zentrierten Normfarbwerte A, B oder C bzw. A_v, B_v oder C_v steht. Den Schwarzanteil erhält man nach

$$s = 100 - (w + v) = 100 - \frac{A(1-C_v) - C(1-A_v)}{A_v - C_v}\,100\,. \tag{5}$$

Aus den Ostwald-Koordinaten Weiss, Schwarz und Vollfarbe ergeben sich in einfachster Weise die von Miescher abgeleiteten modifizierten «Helmholtz-Koordinaten» Sättigung t, Weisslichkeit k und Vollfarbbezug (Bezugshelligkeit) f, ausgedrückt in Prozenten, gemäss den Gleichungen:

$$t = 100\,\frac{v}{w+v}\,, \qquad k = 100\,\frac{w}{w+v}\,, \qquad f = w + v = 100 - s = 100\,N - v\,(1 - N_v)\,, \tag{6}$$

wobei für alle Vollfarben $t = f = 100$ und $k = 0$ gilt.

Tabelle II.–Zentrierte trichromatische Koordinaten der Vollfarben bei Normlichtart C

Typ	Nr.	S	q	λ_m	λ_1	λ_2	X*	Y*	Z*	A_v–C_v	$\bar{x}^*$	y^*
	1		**1,0000**	577,3	524,15		0,7924	0,7924	0,0070	**0,7854**	0,4978	0,4978
	2		**0,9530**	579,1	530,0		0,7852	0,7485	0,0047	**0,7805**	0,5104	0,4865
	3		**0,8676**	582,7	540,0		0,7635	0,6627	0,0023	**0,7612**	0,5345	0,4639
	4		**0,8192**	584,9	545,5	740,0	0,7456	0,6111	0,0015	**0,7441**	0,5490	0,4499
2	5		**0,7794**	586,9	550,0		0,7276	0,5673	0,0011	**0,7265**	0,5614	0,4377
	6		**0,7313**	589,5	555,5		0,7011	0,5129	0,0008	**0,7003**	0,5771	0,4222
	7		**0,6929**	591,8	560,0		0,6757	0,4684	0,0006	**0,6751**	0,5903	0,4092
	8		**0,6359**	595,7	567,0	380,0	0,6300	0,4008	0,0005	**0,6295**	0,6109	0,3886
	9	I	**0,6012**	598,3	567,3	420,0	0,6372	0,3982	0,0379	**0,5993**	0,5937	0,3710
	10		**0,5680**	601,3	567,4	425,0	0,6451	0,3975	0,0719	**0,5732**	0,5788	0,3567
	11		**0,5112**	607,4	567,5	430,0	0,6575	0,3971	0,1248	**0,5327**	0,5575	0,3367
	12		**0,4607**	615,0	567,7	433,0	0,6659	0,3956	0,1647	**0,5012**	0,5431	0,3226
	13		**0,3982**	632,5	567,8	436,0	0,6761	0,3952	0,2093	**0,4668**	0,5280	0,3086
	14		**0,2883**	– 493,3	568,0	440,0	0,6904	0,3942	0,2742	**0,4162**	0,5081	0,2901
	15		**0,2546**	– 493,7	568,1	441,0	0,6937	0,3936	0,2911	**0,4026**	0,5033	0,2855
	16		**0,1585**	– 494,8	568,3	443,5	0,7025	0,3925	0,3341	**0,3684**	0,4916	0,2746
	17		**0,0653**	– 495,8	568,5	445,5	0,7093	0,3913	0,3691	**0,3402**	0,4826	0,2662
	18		**0,0000**	– 496,5	568,61	446,74	0,7136	0,3908	0,3908	**0,3228**	0,4773	0,2614
	19		**0,1745**	– 498,4	568,9	450,0	0,7247	0,3894	0,4479	**0,3353**	0,4640	0,2493
	20	II	**0,4219**	– 502,2	569,6	455,0	0,7391	0,3855	0,5347	**0,3536**	0,4454	0,2323
	21		**0,6422**	– 507,0	570,4	460,0	0,7510	0,3812	0,6187	**0,3698**	0,4289	0,2177
	22		**0,9018**	– 515,5	572,0	466,8	0,7601	0,3722	0,7220	**0,3879**	0,4099	0,2007
1c	23		**1,0000**	– 520,2	572,9	469,48	0,7600	0,3669	0,7600	**0,3931**	0,4028	0,1944
	24		**0,9825**	– 521,0	573,1	470,0	0,7596	0,3657	0,7666	**0,4009**	0,4015	0,1933
	25		**0,9228**	– 524,4	574,0	471,9	0,7566	0,3599	0,7898	**0,4299**	0,3969	0,1888
	26		**0,8417**	– 529,8	575,7	475,0	0,7488	0,3490	0,8240	**0,4750**	0,3896	0,1816
	27		**0,7937**	– 533,3	577,2	477,0	0,7395	0,3391	0,8436	**0,5045**	0,3847	0,1764
	28		**0,7272**	– 538,2	580,0	480,0	0,7198	0,3207	0,8695	**0,5488**	0,3769	0,1679
	29		**0,6571**	– 543,3	584,1	483,0	0,6868	0,2944	0,8916	**0,5972**	0,3667	0,1572
	30		**0,6061**	– 546,9	587,8	485,0	0,6551	0,2715	0,9044	**0,6329**	0,3578	0,1483
	31		**0,5447**	– 551,0	593,0	487,0	0,6087	0,2414	0,9157	**0,6743**	0,3447	0,1367
	32		**0,4639**	– 556,0	600,9	489,0	0,5370	0,2006	0,9257	**0,7251**	0,3229	0,1206
	33	III	**0,3836**	– 560,4	610,0	490,4	0,4570	0,1613	0,9322	**0,7709**	0,2947	0,1040
	34		**0,3111**	– 564,2	620,0	491,2	0,3783	0,1267	0,9354	**0,8087**	0,2626	0,0880
	35		**0,2559**	– 566,8	630,0	491,7	0,3152	0,1012	0,9375	**0,8363**	0,2328	0,0747
	36		**0,2169**	446,0	640,0	492,0	0,2695	0,0842	0,9387	**0,8545**	0,2085	0,0652
	37		**0,1915**	455,7	650,0	492,2	0,2390	0,0731	0,9395	**0,8664**	0,1910	0,0584
	38		**0,1761**	459,8	660,0	492,3	0,2204	0,0666	0,9399	**0,8733**	0,1796	0,0543
	39		**0,1595**	463,3	740,0	492,4	0,2000	0,0595	0,9403	**0,8808**	0,1667	0,0496
	40		**0,1472**	465,4	380,0	496,5	0,2008	0,0708	0,9542	**0,8834**	0,1638	0,0578
2c	41		**0,1351**	467,0	380,0	500,0	0,2011	0,0820	0,9636	**0,8816**	0,1613	0,0658
	42		**0,0915**	471,6	380,0	510,0	0,2015	0,1229	0,9818	**0,8589**	0,1543	0,0941
	43		**0,0307**	475,8	380,0	520,0	0,2044	0,1795	0,9909	**0,8114**	0,1487	0,1306

Der Vollfarbbezug ermöglicht erst eine systematische Zuordnung aller Körperfarben im Rahmen des Vollfarbsystems, im Gegensatz zu der von Helmholtz empfohlenen Helligkeit (oder Leuchtdichte), die bei Vollfarben gemäss ihrem Farbton in charakteristischer Weise zwischen 5% (Blau) und 95% (Gelb) schwankt. Übrigens ergibt sich nach Ostwald die Helligkeit h einer Körperfarbe nach der Gleichung

$$h = \frac{h_0 \cdot t + w}{100}, \qquad (7)$$

wobei h_0 die spezifische Helligkeit ($= Y_v$) der betreffenden Vollfarbe bedeutet.

Wenn im Vollfarbsystem eine Körperfarbe abgesehen vom Farbton durch Weiss-, Schwarz- und Vollfarbanteil nach Ostwald oder Sättigung, Weisslichkeit und Vollfarbbezug nach Helmholtz-Miescher gekennzeichnet wird, so bedeutet dies wegen der Beziehungen

$$\begin{aligned} w + s + v &= 100, \\ t + k &= 100 \end{aligned} \qquad (8)$$

keine Überbestimmung. Meist beschränkt man sich auch auf die Angabe von Weiss- und Schwarzanteil nach der einen oder Sättigung und Vollfarbbezug nach der anderen Bezeichnungsweise.

5. Der Farbtonquotient und die praktische Ermittlung farbtongleicher Vollfarben

Die Berechnung der Vollfarbkoordinaten[1] nach den Formeln (4) bis (8) setzt die Möglichkeit voraus, diejenige Vollfarbe rasch und sicher aufzufinden, die mit der vorgegebenen und durch ihre trichromatischen Normfarbwerte charakterisierten Farbe *farbtongleich* ist. Mit Hilfe der Tabellen von Foss, Nickerson und Granville[2] ist dies nur schätzungsweise möglich, da dort die Normfarbwerte der Vollfarben (unter Normlichtart C) nach Grenzwellenlängen geordnet sind. Man kann sich dadurch helfen, dass man die charakteristische oder mittlere Wellenlänge der Vollfarben (dominant wave length) λ_m graphisch ermittelt[3] und auf gleiche Weise diejenige

[1] Unter Vollfarbkoordinaten sind auf Vollfarben bezogene Ostwald- oder Helmholtz-Koordinaten zu verstehen.

[2] C. F. Foss, D. Nickerson und W. C. Granville, J. Opt. Soc. Amer. *34*, 361 (1944).

[3] Zum Beispiel mit Hilfe der Diagramme im *Handbook of Colorimetry* von A. C. Hardy, S. 61–85.

Tabelle II.–Zentrierte trichromatische Koordinaten der Vollfarben bei Normlichtart C

Typ	Nr.	S	q	λ_m	λ_1	λ_2	X*	Y*	Z*	A_v–C_v	x*	y*
2c	1′		**0,0000**	477,2	380,0	524,15	0,2076	0,2076	0,9930	**0,7854**	0,1474	0,1474
	2′		**0,0470**	479,2		530,0	0,2148	0,2515	0,9953	**0,7805**	0,1470	0,1721
	3′		**0,1324**	482,1		540,0	0,2365	0,3373	0,9977	**0,7612**	0,1505	0,2146
	4′		**0,1808**	483,5		545,5	0,2544	0,3889	0,9985	**0,7441**	0,1550	0,2369
	5′		**0,2206**	484,6		550,0	0,2724	0,4327	0,9989	**0,7265**	0,1599	0,2539
	6′		**0,2687**	485,7		555,5	0,2989	0,4871	0,9992	**0,7003**	0,1674	0,2729
	7′		**0,3071**	486,6		560,0	0,3243	0,5316	0,9994	**0,6751**	0,1748	0,2865
	8′		**0,3641**	487,8		567,0	0,3700	0,5992	0,9995	**0,6295**	0,1879	0,3044
1	9′	IV	**0,3988**	488,5	420,0	567,3	0,3628	0,6018	0,9621	**0,5993**	0,1883	0,3123
	10′		**0,4320**	489,1	425,0	567,4	0,3549	0,6025	0,9281	**0,5732**	0,1882	0,3195
	11′		**0,4888**	490,1	430,0	567,5	0,3425	0,6029	0,8752	**0,5327**	0,1881	0,3312
	12′		**0,5393**	490,9	433,0	567,7	0,3341	0,6044	0,8353	**0,5012**	0,1884	0,3407
	13′		**0,6018**	491,8	436,0	567,8	0,3239	0,6048	0,7907	**0,4668**	0,1884	0,3518
	14′		**0,7117**	493,3	440,0	568,0	0,3096	0,6058	0,7258	**0,4162**	0,1886	0,3691
	15′		**0,7454**	493,7	441,0	568,1	0,3063	0,6064	0,7089	**0,4026**	0,1889	0,3740
	16′		**0,8415**	494,8	443,5	568,3	0,2975	0,6075	0,6659	**0,3684**	0,1894	0,3867
	17′		**0,9347**	495,8	445,5	568,5	0,2907	0,6087	0,6309	**0,3402**	0,1900	0,3978
	18′	V	**1,0000**	496,5	446,74	568,61	0,2864	0,6092	0,6092	**0,3228**	0,1903	0,4048
	19′		**0,8255**	498,4	450,0	568,9	0,2753	0,6106	0,5521	**0,3353**	0,1914	0,4246
	20′		**0,5781**	502,2	455,0	569,6	0,2609	0,6145	0,4653	**0,3536**	0,1946	0,4583
	21′		**0,3578**	507,0	460,0	570,4	0,2490	0,6188	0,3813	**0,3698**	0,1993	0,4954
	22′		**0,0982**	515,5	466,8	572,0	0,2399	0,6278	0,2780	**0,3879**	0,2094	0,5480
	23′	VI	**0,0000**	520,2	469,48	572,9	0,2400	0,6331	0,2400	**0,3931**	0,2156	0,5688
	24′		**0,0175**	521,0	470,0	573,1	0,2404	0,6343	0,2334	**0,4009**	0,2169	0,5724
	25′		**0,0772**	524,4	471,9	574,0	0,2434	0,6401	0,2102	**0,4299**	0,2225	0,5853
	26′		**0,1583**	529,8	475,0	575,7	0,2512	0,6510	0,1760	**0,4750**	0,2330	0,6038
	27′		**0,2063**	533,3	477,0	577,2	0,2605	0,6609	0,1564	**0,5045**	0,2417	0,6132
	28′		**0,2728**	538,2	480,0	580,0	0,2802	0,6793	0,1305	**0,5488**	0,2571	0,6232
	29′		**0,3429**	543,3	483,0	584,1	0,3132	0,7056	0,1084	**0,5972**	0,2779	0,6260
	30′		**0,3939**	546,9	485,0	587,8	0,3449	0,7285	0,0956	**0,6329**	0,2950	0,6232
	31′		**0,4553**	551,0	487,0	593,0	0,3913	0,7586	0,0843	**0,6743**	0,3170	0,6146
	32′		**0,5361**	556,0	489,0	600,9	0,4630	0,7994	0,0743	**0,7251**	0,3464	0,5980
	33′		**0,6164**	560,4	490,4	610,0	0,5430	0,8387	0,0678	**0,7709**	0,3746	0,5786
	34′		**0,6889**	564,2	491,2	620,0	0,6217	0,8733	0,0646	**0,8087**	0,3986	0,5600
	35′		**0,7441**	566,8	491,7	630,0	0,6848	0,8988	0,0625	**0,8363**	0,4160	0,5460
	36′		**0,7831**	568,5	492,0	640,0	0,7305	0,9158	0,0613	**0,8545**	0,4278	0,5363
	37′		**0,8085**	569,7	492,2	650,0	0,7610	0,9269	0,0605	**0,8664**	0,4353	0,5301
	38′		**0,8239**	570,3	492,3	660,0	0,7796	0,9334	0,0601	**0,8733**	0,4397	0,5264
2	39′		**0,8405**	571,0	492,4	740,0	0,8000	0,9405	0,0597	**0,8808**	0,4444	0,5224
	40′		**0,8528**	571,5	496,5	740,0	0,7992	0,9292	0,0458	**0,8834**	0,4505	0,5237
	41′		**0,8649**	572,0	500,0	740,0	0,7989	0,9180	0,0364	**0,8816**	0,4557	0,5236
	42′		**0,9085**	573,8	510,0	740,0	0,7985	0,8771	0,0182	**0,8589**	0,4714	0,5178
	43′		**0,9693**	576,2	520,0	740,0	0,7956	0,8205	0,0091	**0,8114**	0,4895	0,5049

der vorgegebenen Farbe, worauf man die Farbtongleichheit zahlenmässig feststellen kann.

Direkter und genauer führen jedoch aus den trichromatischen Koordinaten rechnerisch abgeleitete Parameter zum Ziel. Farbtongleichheit (im mischmetrischen Sinn) oder gleiche charakteristische Wellenlänge bedeutet ja nichts anderes, als dass die Orte der gegebenen Farbe, der farbtongleichen Vollfarbe und der Vergleichsspektralfarbe im trichromatischen Dreieck auf einer Geraden durch den *Beleuchtungspunkt* liegen. In der zentrierten IBK-Farbtafel, in der letzterer mit dem Dreiecksmittelpunkt zusammenfällt, lässt sich diese geometrische Bedingung besonders einfach formulieren. Sämtliche Farbpunkte auf einer Geraden vom Dreiecksmittelpunkt aus genügen nämlich der Bedingung

$$q = \frac{B-C}{A-C}, \qquad (9)$$

q ist der Farbtonquotient nach MIESCHER[1]; für die zugehörigen Gegenfarben auf der gleichen Geraden jenseits des Mittelpunkts gilt

$$q' = \frac{B'-C'}{A'-C'} = 1-q\,. \qquad (10)$$

Durch die früher eingeführte Nebenbedingung $A > B > C$ bzw. $A' > B' > C'$ wird dafür gesorgt, dass die beiden Abschnitte diesseits und jenseits des Mittelpunkts eindeutig definiert sind und dass q nur zwischen 0 und + 1 variiert. Den Verlauf von q um das IBK-Farbdreieck zeigt Abbildung 4. Gleichzeitig kann man daraus ablesen, wie die q-Teilung durch geometrische Addition von Bruchteilen einer Koordinate zur Einheit der andern zustande kommt[1].

Die Verwendung von q ermöglicht auf einfache Weise, im mischmetrischen Sinne farbtongleiche Farben beliebiger Art zu ermitteln, weshalb wir in den Tabellen I und II die trichromatischen Koordinaten der Vollfarben nach q-Werten geordnet haben, wobei die zwangslose Überbrückung der spektralen Lücke im violetten Gebiet zu beachten ist. Der Farbtonkreis wird je nach den

[1] K. MIESCHER, Z. techn. Physik *11*, 66 (1930).

[1] Ähnliche Farbton-Masszahlen haben A. KLUGHARDT, Z. techn. Physik *8*, 290 (1927); *10*, 101 (1929); E. HASCHEK, Sitz.-Ber. Akad. Wiss. Wien IIa *136*, 462 (1927), und M. RICHTER, Licht *5*, 124 (1935), benützt.

Grössenverhältnissen der zentrierten Normfarbwerte X^*, Y^* und Z^* in sechs Sektoren unterteilt, die mit römischen Zahlen bezeichnet sind, beginnend mit I für

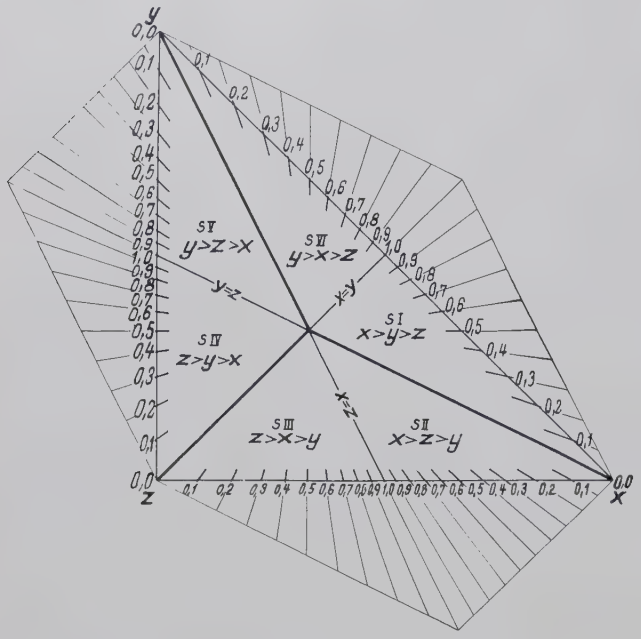


Abb. 4. Sektoreinteilung und q-Werte im IBK-Dreieck.

$X^* > Y^* > Z^*$, also $X^* = A$, $Y^* = B$ und $Z^* = C$ im gelb-roten und endend mit VI für $Y^* = A$, $X^* = B$ und $Z^* = C$ im grün-gelben Sektor (Abb. 4). Auf den Sektorgrenzen nimmt q abwechslungsweise den Wert 0 und +1 an. Da der Verlauf von q an diesen Stellen umkehrt, ist bei der Interpolation Vorsicht am Platze. Zur Vereinfachung haben wir in den Tabellen I und II die genau auf den Sektorgrenzen liegenden Werte eingefügt[1].

Es ergibt sich als einfache Regel zur Sektoreinteilung, dass die den Sektoren entsprechenden Teildreiecke zur Ecke der grössten Koordinate hinweisen und auf der Seite der zweitgrössten liegen. Je zwei gegenüberliegende Sektoren enthalten Gegenfarben, deren q-Werte sich zu 1 ergänzen. Sind die Koordinaten der einen Vollfarbe A, B und C, so betragen diejenigen der Gegenvollfarbe $A' = 1 - C$, $B' = 1 - B$ und $C' = 1 - A$. Die in den Umrechnungsformeln (4) und (5) auftretenden charakteristischen Differenzen A–C, die in den Tabellen I und II gesondert aufgeführt werden, sind demnach für Vollfarbe und Gegenvollfarbe gleich. Ganz allgemein bedeutet Gleichheit der A–C-Werte, dass sich zwei Gegenfarben bei gleichteiliger Mischung zu Unbunt ergänzen.

Der Zusammenhang zwischen q, den Grenzwellenlängen λ_1 und λ_2, den charakteristischen Wellenlängen λ_m, sowie der Typen- und Sektoreinteilung ist in den Abbildungen 5 und 6 graphisch dargestellt. λ_1 und λ_2 sind natürlich für je zwei Gegenfarben gleich, während λ_m im Prinzip für Gegenfarben verschieden ist; im grossen Gebiet der Purpurfarben wird die komplementäre Wellenlänge mit einem Minuszeichen zur Charakterisierung verwendet.

6. *Analytische und geometrische Kennzeichnung der Körperfarben*

Die in den Abbildungen 1 und 2 dargestellten idealisierten Farben (Kurven b und b') wurden für Normlichtart C aus den (zentrierten) Normfarbwerten der realen Farben (Kurven a und a') ermittelt. Die Anteile an Weiss, Vollfarbe und Schwarz nach Ostwald sind aus

[1] Durch Einführung negativer q-Werte könnten 3 der 6 Unstetigkeitsstellen zum Verschwinden gebracht werden. Die Bildungsregel für den Farbtonquotienten wird jedoch umständlicher, indem für die 3 Sektorenpaare 3 verschiedene Formeln angegeben werden müssten.

Tabelle III

	Farbkoordinaten		Tiefgrüne Farbe		Hellgelb-grüne Farbe der Umschlagsseite	
			Normlichtart A	Normlichtart C	Normlichtart A	Normlichtart C
	Trichromatische Koordinaten					
1						
2	Zentrierte Normfarbwerte (Y^* = Helligkeit)	X^*	0,1128 (C)	0,1192 (B)	0,5840 (B)	0,5699 (B)
3		Y^*	0,2141 (A)	0,2660 (A)	0,5993 (A)	0,6057 (A)
		Z^*	0,1279 (B)	0,1036 (C)	0,4693 (C)	0,4603 (C)
4	Helligkeit der farbtongleichen Vollfarbe . . .	Y_v^*	0,5819	0,6427	0,8987	0,9030
5						
6	Zentrierte Normfarbanteile, Dreieckskoordinaten	x^*	0,2480 (c)	0,2439 (b)	0,3534 (b)	0,3484 (b)
7	($x^*+y^*+z^*=1$)	y^*	0,4708 (a)	0,5442 (a)	0,3626 (a)	0,3703 (a)
		z^*	0,2812 (b)	0,2119 (c)	0,2840 (c)	0,2814 (c)
	Farbtonkennzeichnung					
8	Farbtonquotient	q	0,1491	0,0961	0,8823	0,7538
9	Sektor	S	V	VI	VI	VI
10	Farbtongleiche Spektralfarbe	λ	523,0 mμ	525,6 mμ	575,6 mμ	567,0 mμ
	Vollfarbkoordinaten					
	a) nach Ostwald $v+w+s=100$					
11	Vollfarbe	v	30,7%	36,9%	15,7%	17,3%
12	Weiss	w	3,6%	2,9%	38,1%	44,9%
13	Schwarz	$s=100-f$	65,7%	60,2%	46,2%	37,8%
	b) nach Helmholtz-Miescher $k+t=100$					
14	Vollfarbsättigung	$t=v/f\cdot 100$	89,4%	92,7%	29,1%	27,8%
15	Weisslichkeit	$k=w/f\cdot 100$	10,6%	7,3%	70,9%	72,2%
16	Vollfarbbezug	$f=w+v$	34,3%	39,8%	53,8%	62,2%

den Darstellungen ohne weiteres ersichtlich[1]. Dabei gibt Abbildung 1 ein durch Ausfärbung auf gelatiniertem Papier gewonnenes Grün höchstmöglicher Sättigung[2],

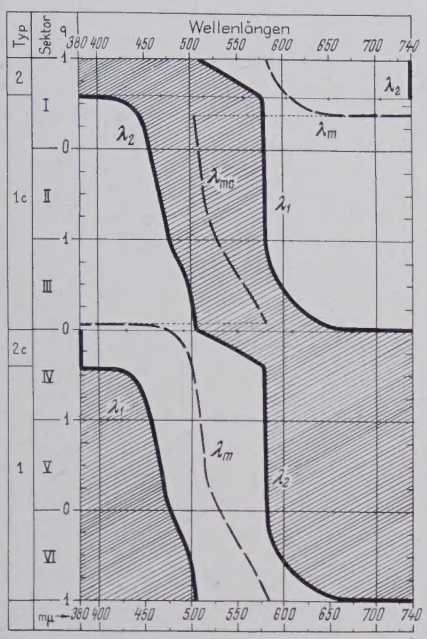


Abb. 5. Typen- und Sektoreinteilung, sowie Grenzwellenlängen λ_1 und λ_2 und charakteristische Wellenlängen λ_m der Vollfarben, bzw. λ_{mc} der Gegenvollfarben als Funktion des Farbquotienten q bei Normlichtart A.

Abbildung 2 das helle Gelbgrün des Umschlags dieser Zeitschrift[3] wieder.

Die trichromatischen und die Vollfarbkoordinaten der beiden Farbproben sind in Tabelle III zusammengestellt, sowohl gemäss der für unsere Verhältnisse eher etwas blaustichigen, besonders in den USA. als künstliches Tageslicht bevorzugten Normlichtart C, wie für die Normlichtart A, welche dem ungefilterten Licht einer elektrischen Glühbirne entspricht (Abendbeleuchtung). Die zentrierten Normfarbwerte (Zeilen 1 bis 3) wurden für Normlichart C mit dem automatischen, mit dem Spektrophotometer gekoppelten Integrator, für Normlichtart A durch Integration der Remissionskurven nach der 30-Auswahlordinaten-Methode bestimmt und mit ihrer Hilfe die Koordinaten der Farbtafel

$$x^* = \frac{X^*}{X^* + Y^* + Z^*} \quad \text{und} \quad y^* = \frac{Y^*}{X^* + Y^* + Z^*}$$

(Zeilen 5–7) berechnet. Formel (9) ergibt den Farbtonquotient (Zeile 8). Aus ihm sowie dem Farbsektor (Zeile 9) ermittelt man die Wellenlänge[4] der farbtongleichen Spektralfarbe (Zeile 10), sei es aus den Abbildungen 5 und 6 oder aus den Tabellen I und II; letzteren entnimmt man die Koordinaten der farbtongleichen Vollfarbe und damit deren Helligkeit (Zeile 4).

[1] Wie aus den Abbildungen 1 und 2 durch Projektion der idealisierten Kurven auf die Ordinate zu entnehmen ist, lässt sich jede Farbe durch einen senkrechten Strich darstellen, dessen Länge dem Vollfarbanteil v entspricht, während untere und obere Lücke ihren Weissanteil w und Schwarzanteil s charakterisieren [siehe K. Miescher, Z. Sinnesphysiol. *57*, 101 (1925); R. Rometsch und K. Miescher, Exper. *9*, 307 (1953)].

[2] Solche Ausfärbungen verwenden wir neuerdings für Farbkreisteilungen, R. Rometsch und K. Miescher, Exper. *9*, 307 (1953).

[3] Wird am Licht ziemlich rasch gelber.

[4] Für praktische Zwecke ist allerdings der Bezug auf eine stufenmetrisch bestimmte Farbkreisteilung zweckmässiger.

Es liegen nun alle Daten zur Bestimmung der «Vollfarbkoordinaten» vor: Die Formeln (4) und (5) ergeben die Ostwald-Koordinaten (Zeilen 11–13) und die Formeln (6) die Koordinaten nach Helmholtz-Miescher (Zeilen 14–16).

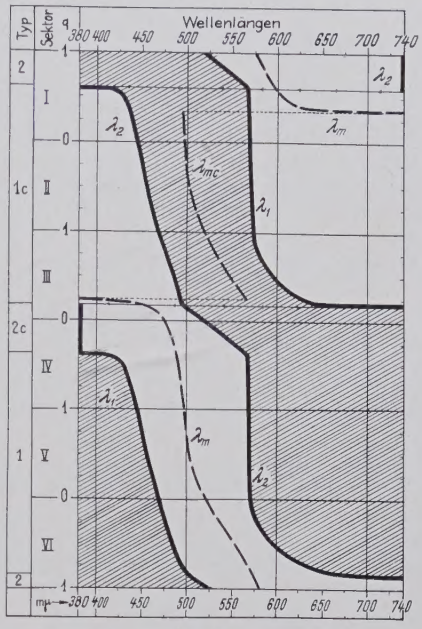


Abb. 6. Typen- und Sektoreinteilung, sowie Grenzwellenlängen λ_1 und λ_2 und charakteristische Wellenlängen λ_m der Vollfarben, bzw. λ_{mc} der Gegenvollfarben als Funktion des Farbtonquotienten q bei Normlichtart C.

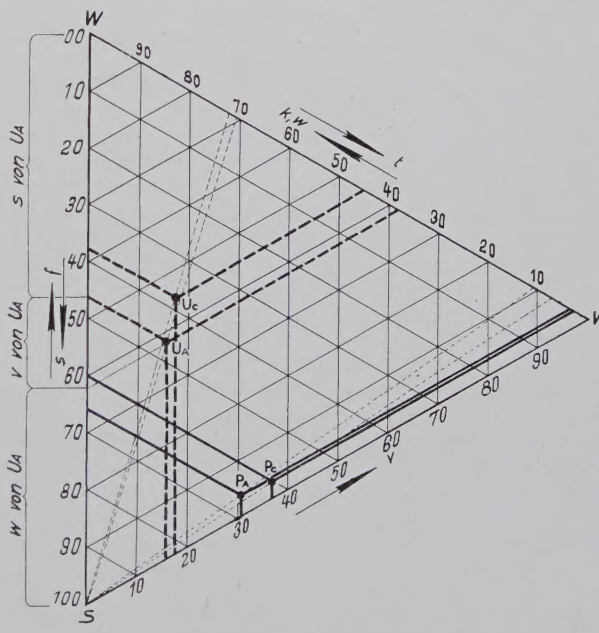


Abb. 7. Farbtongleiches Dreieck mit den Ostwald-Koordinaten als Dreieckskoordinaten. w = Weissanteil, s = Schwarzanteil, v = Vollfarbanteil, t = Vollfarbsättigung, k = Weisslichkeit, f = Vollfarbbezug. P_A und P_C Farbpunkte der tiefgrünen Färbung, U_A und U_C Farbpunkte des hellgelbgrünen Umschlages dieser Zeitschrift bei den Normlichtarten A und C.

Die trichromatische Farbtafel gestattet lediglich die Festlegung der Lage einer Farbe nach Farbton und tri-

chromatischer Sättigung[1]; für unsere beiden Beispiele, P tiefes Grün, und U Farbe der Umschlagsseite, sind die Farbpunkte in Abbildung 3 eingezeichnet. Abstrahiert man vom Farbton, so lässt sich der Zusammenhang zwischen den beiden Vollfarbkoordinatenpaaren, den «Ostwald-» und den «Helmholtz-Koordinaten», am anschaulichsten geometrisch durch ein (mischmetrisch) farbtongleiches Dreieck zur Darstellung bringen. Dabei wählt man zweckmässig ein gleichseitiges, da die Frage der richtigen Stufung in der Mischmetrik nicht gelöst werden kann. In Abbildung 7 sind die Farbpunkte in einem solchen Dreieck wiederum für die beiden grünen bzw. gelbgrünen Farbbeispiele und die Normlichtarten A und C wiedergegeben.

Es sei daran erinnert, dass sich im farbtongleichen Dreieck parallel zur WS-Seite vollfarbgleiche, parallel zur WV-Seite schwarzgleiche und parallel zur SV-Seite weissgleiche Farben befinden. Vom Schwarzpunkt nach der WV-Seite ausgehende Strahlen stellen Farben gleicher Sättigung bzw. gleicher Weisslichkeit dar. Bezugsgleiche Farben liegen wie die schwarzgleichen auf Parallelen zur WV-Seite. Im übrigen befinden sich Farben gleicher Helligkeit oder Leuchtdichte auf Parallelen zu der Geraden zwischen V und jenem Punkte auf der WS-Seite, welcher der Helligkeit Y_v^* der entsprechenden Vollfarbe entspricht. Diese Y_v^*-Werte sind unseren beiden Tabellen I und II zu entnehmen (für die beiden Farbbeispiele der Tabelle III, Zeile 4).

Es sei hier nur erwähnt, dass das farbtongleiche Dreieck zwar den weitaus überwiegenden Teil realisierbarer Körperfarben umfasst, ein kleiner Teil, vor allem sehr gesättigter roter und grüner Farben, jedoch ausserhalb des Dreiecks zu liegen kommt und mit negativem Weiss- bzw. Schwarzgehalt gekennzeichnet werden muss. Es betrifft dies das Gebiet der «übersättigten» ($t > 100$) und «überklaren» ($f > 1$) Farben ausserhalb der SV- bzw. WV-Seite[2].

Was aus der trichromatischen Farbtafel Abbildung 3 nicht ersichtlich war, erkennt man sofort aus Abbildung 7, wie weit nämlich die mit den reinsten zur Verfügung stehenden Farbstoffen hergestellte tiefgrüne Färbung noch vom Ideal der Vollfarbe entfernt, wie auffallend gross ihr Schwarzgehalt ist. Die entsprechende Beobachtung hat vor 40 Jahren Ostwald zur Aufstellung der Hypothese vom «natürlichen» Schwarzgehalt kalter Farben bewogen, die zwar nie anerkannt, jedoch bis heute noch nicht durch die Auffindung schwarzärmerer, grüner, blauer und violetter Farbstoffe widerlegt worden ist.

Weiter ergibt sich aus Abbildung 7, dass sich beim Übergang von Tageslicht (Normlichtart C) zu künstlicher Beleuchtung (Normlichtart A) der Schwarzanteil bei beiden Farbbeispielen erhöht; bei der tiefgrünen Farbe nimmt überdies der Weissanteil zu und die Sättigung ab; gerade das Umgekehrte gilt für die hellgelbgrüne Farbe, sie wird etwas weniger weiss und damit gesättigter, trotz abnehmendem Vollfarbanteil.

7. *Schluss*

Die blosse Angabe trichromatischer Daten und selbst ihre Darstellung in der trichromatischen Farbtafel fand trotz vielfacher Bemühungen, besonders in Europa, nur sehr beschränkten Eingang in den praktischen Gebrauch. In der Tat ist das trichromatische Zahlentripel zu wirklichkeitsfern; dagegen ermöglicht seine Transformation in Vollfarbkoordinaten, sei es nach Ostwald oder Helmholtz-Miescher, eine viel anschaulichere Kennzeichnung der Körperfarben. Bei der Darstellung im (mischmetrisch) farbtongleichen Dreieck ergibt sich besonders klar, wie die beiden Koordinatenpaare sich gegenseitig ergänzen und zueinander komplementär sind. Eine solche Wiedergabe der Farben, besonders unter Mitverwendung einer geeigneten Farbkreiseinteilung, bedeutet für viele Zwecke, nicht zuletzt für den Farbstoffchemiker und Färber, eine grosse Hilfe.

Allerdings bilden die Vollfarben einen an sich willkürlichen Spezialfall. An ihrer Stelle könnten auch andere charakteristische Reinfarben, zum Beispiel die spektralgesättigten Reinfarben nach Arens[1] oder die trichromatischen Reinfarben nach Miescher[2], gewählt werden; die angegebenen Transformationen und die geschilderten Beziehungen im farbtongleichen Dreieck wären gleichermassen gültig. Mit dieser Andeutung müssen wir es hier bewenden lassen.

Eine Klärung der misch- oder reizmetrischen Begriffe schien uns unerlässlich, wenn mit Erfolg das Reich der Stufenmetrik erschlossen werden soll. Hier befindet sich noch alles im Flusse[3].

Frau M. Thürkauf danken wir für die Ausführung der Berechnungen und Zeichnungen.

Summary

After a short discussion of the relations between the different color coordinate systems formulae are derived which allow the transformation of tristimulus values to full color coordinates in a simple way. The tristimulus values are first "centred", i.e. the whole chromacity diagram is transformed in a manner to bring the illumination point in the centre of the triangle (x = 0·333 and y = 0·333). The centred tristimulus values of the pure full colors used as parameters are given in 2 tables for illumination A and C. The problem of finding the full color of the same hue as a given color is solved by means of the hue quotient, $q = B–C/A–C$, where A, B and C are the tristimulus values with the conditions $A > B > C$. This quotient must be the same for every color of the same hue. The relations between the full color coordinates according to Ostwald and to Helmholtz are demonstrated graphically.

[1] Der trichromatische Sättigungsbegriff ist nicht eindeutig, sondern lässt verschiedene Definitionen zu.

[2] Siehe hiezu K. Miescher, Z. Sinnesphysiol. *57*, 76 (1925); Z. techn. Physik *11*, 233 (1930); R. Luther, Z. techn. Physik *8*, 540 (1927).

[1] H. Arens, Physik. Z. *43*, 43 (1942).

[2] K. Miescher, Z. techn. Physik *11*, 66 (1930).

[3] In diesem Zusammenhang verweisen wir, abgesehen von unserer symmetrischen Farbkreisteilung, zum Beispiel auf die ausgedehnten amerikanischen Bestrebungen um das Munsell-Farbsystem, auf die Schwellenbestimmungen von McAdam im Farbraum und die interessanten Bemühungen um ein neues Farbsystem von M. Richter in Deutschland (siehe die neue Zeitschrift «Die Farbe»).

Congressus

HOLLAND

Internationales Symposium über elektrische Entladungen in Gasen

Delft – 25.–30. April 1955

Die Technische Hochschule in Delft veranstaltet gemeinsam mit den Philips Werken in Eindhoven, unterstützt durch die Internationale Union für reine und angewandte Physik ein Internationales Symposium mit folgenden Hauptreferenten: H. S. W. Massey, London; L. B. Loeb, Berkeley; Chr. van Geel, Delft; S. C. Brown, Cambridge, USA.; M. A. Biondi, East Pittsburgh; W. Lochte-Holtgreven, Kiel; J.-M. Meek, Liverpool.

Alle Auskünfte erteilt: Prof. A. W. van Wagensveld, Symposiumsekretär, Mijnbouwplein 11, Delft, Holland.

Die Erforschung der Wirkstoffe des Mutterkorns beschäftigte namhafte Chemiker und Apotheker während Jahrzehnten. Einen ersten Markstein bedeutete die Entdeckung und Reindarstellung des Alkaloids Ergotamin in den Laboratorien der Sandoz A.G., wo in der Folge auch die Auffindung und Herstellung weiterer für die Medizin äusserst wertvoller Mutterkorn-Reinalkaloide gelang. Neue therapeutische Aspekte eröffnete die erstmals bei Sandoz erfolgte Hydrierung dieser Stoffe. Folgende Präparate sind das Ergebnis dieser Forschungen:

Cafergot

Dihydroergotamin-Sandoz

Gynergen

Hydergin

Methergin

Neo-Gynergen

Partergin

SANDOZ

S A N D O Z A. G.

Lehrbücher und Monographien aus dem Gebiete der exakten Wissenschaften

Reihe der experimentellen Biologie

Pflanzliche Infektionslehre

Lehrbuch der allgemeinen Pflanzenpathologie. Von Prof. Dr. E. Gäumann, ETH., Zürich. 681 Seiten mit 467 Figuren (2. Auflage 1951). Ganzleinen Fr. 46.30.

Einführung in die physiologische Embryologie

Von Prof. Dr. F. E. Lehmann, Universität Bern. 414 Seiten mit 132 Figuren und 17 Tabellen (1946). Ganzleinen Fr. 39.50.

Die Signalübermittlung im Nerven

Von Prof. Dr. A. von Muralt, Universität Bern. 354 Seiten mit 132 Figuren, 3 mehrfarbigen Tafeln und 24 Tabellen (1946). Ganzleinen Fr. 43.70.

Die Pilze

Grundzüge ihrer Entwicklungsgeschichte und Morphologie. Von Prof. Dr. Ernst Gäumann, ETH., Zürich. 382 Seiten mit 440 Figuren (1949). Ganzleinen Fr. 39.50.

Grundriss zu einer Balneobiologie der Thermen

Von Prof. Dr. Vale Vouk, Universität Zagreb. 88 Seiten mit 22 Figuren (1950). Ganzleinen Fr. 14.55.

Vergleichende Physiologie

in 6 Bänden. Von Prof. Dr. W. von Buddenbrock, Universität Mainz.

Band I: *Physiologie der Sinnesorgane*. 504 Seiten mit 256 Figuren (1952). Ganzleinen Fr. 45.75. – Band II: *Physiologie des Nervensystems*. 396 Seiten mit 183 Figuren (1953). Ganzleinen Fr. 38.50. – Band III: *Ernährungsphysiologie*. Befindet sich in Vorbereitung. Band IV: *Hormone*. 492 Seiten, 115 Figuren und 106 Tabellen. (1950) Ganzleinen Fr. 49.40. – Die Bände V und VI befinden sich ebenfalls in Vorbereitung.

Endosymbiose der Tiere mit pflanzlichen Mikroorganismen

Von Prof. Dr. P. Buchner, vormals Universität Leipzig. 771 Seiten mit 336 Figuren und 3 Tafeln. (1953) Ganzleinen Fr. 66.50.

Planen und Auswerten von Versuchen

Eine Einführung für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure. Von Prof. Dr. Arthur Linder, Professor für mathematische Statistik an der Universität Genf und an der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich. 182 Seiten mit 9 Figuren, Ganzleinen Fr. 21.–. (1953).

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung

Birkhäuser Verlag · Basel/Stuttgart